

CLAUDINE MATTE

**ÉVÉNEMENTS INFLAMMATOIRES CONDUISANT AU
DÉVELOPPEMENT DE LEISHMANIOSES**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

**BIOLOGIE MÉDICALE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

JUIN 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-54022-7

Canada

RÉSUMÉ COURT

Le parasite intracellulaire *Leishmania* cause divers types de pathologies affectant principalement la peau (leishmaniose cutanée) et les viscères (leishmaniose viscérale). L'objectif poursuivi par ce projet de recherche était de déterminer les événements inflammatoires, impliqués dans le développement de ces pathologies grâce au modèle *in vivo* de la poche d'air chez la souris. De plus, nous étions intéressés à identifier les voies de signalisation (ie voies dépendantes des protéines kinases/phosphatases) impliquées dans l'induction de molécules inflammatoires (ie chimiokines, prostaglandines PGE₂) lors de l'infection par le parasite *Leishmania*.

RÉSUMÉ LONG

Le parasite intracellulaire *Leishmania* est l'agent causal de diverses pathologies affectant la peau (leishmanioses cutanée et muco-cutanée) ainsi que les viscères (leishmaniose viscérale). Les événements inflammatoires menant au développement de ces deux pathologies demeurent encore peu connus. Les buts de ce projet de recherche étaient dans un premiers temps de discerner les mécanismes inflammatoires conduisant au développement des leishmanioses. Le modèle murin de la poche d'air nous a permis de reproduire le site d'inoculation du vecteur au niveau de la peau. L'injection de *L. major* dans la poche d'air a mené à la plus importante accumulation de leucocytes (30X) par rapport au témoin et aux autres stimulations, au temps 6 hrs. Au contraire, l'ajout de *L. donovani* recrute un nombre beaucoup moins important de cellules (7X par rapport au témoin). Toutefois, ce recrutement leucocytaire est similaire pour les deux espèces de *Leishmania* et se compose de neutrophiles (50%), de macrophages (30%) et d'éosinophiles (20%). Cet important influx de leucocytes en réponse à *L. major* est accompagné d'une forte libération de cytokines proinflammatoires (TNF- α et IL-1 β) ainsi que de l'induction des gènes de chimiokines et de leurs récepteurs. Au contraire, *L. donovani* induit faiblement ces événements inflammatoires au site d'inoculation. Plus particulièrement, il y a une plus faible expression des récepteurs de chimiokines induite par *L. donovani*, résultant en un taux minime de cellules recrutées au site. Le *L. major* est donc un meilleur inducteur de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs, provoquant une réponse inflammatoire plus importante. Dans un second temps, diverses voies de signalisation menant possiblement à l'induction des chimiokines ont été évaluées. L'utilisation d'un puissant inhibiteur de phosphotyrosines (PTPs), le bpV(phen), *in vivo* dans le modèle d'infection cutanée grâce à un système de souris à poche d'air et *in vitro*, chez des macrophages murins (B10R), a permis d'établir un rôle important pour les PTPs comme régulateurs négatifs de la signalisation cellulaire conduisant à l'expression des gènes de chimiokines. Nos résultats suggèrent que la SHP-1, un régulateur négatif de la signalisation cellulaire, est impliquée dans l'expression de plusieurs chimiokines grâce à l'utilisation de macrophages dérivés de souris déficientes en SHP-1. Finalement, la sécrétion de la PGE₂ observée tôt suite à

l'infection à *Leishmania* impliquerait l'induction de la voie dépendante de la PKC régulant les événements biochimiques menant à l'expression de la cyclooxygénase-2.

En somme, l'infection à *Leishmania* représente un système multifactoriel impliquant une grande variété de médiateurs inflammatoires qui y jouent un rôle de façon séquentielle. Cette étude pourrait permettre l'élaboration d'une nouvelle thérapie anti-leishmaniose.

AVANT-PROPOS

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Martin Olivier pour m'avoir donné la chance de poursuivre mes études graduées dans son laboratoire. Son encadrement ainsi que ses grandes connaissances scientifiques ont permis mon épanouissement scientifique. Je voudrais aussi remercier le Centre de Recherches en Infectiologie pour m'avoir fourni l'opportunité d'y effectuer mes études. De plus, je remercie le CRM (Conseil de Recherches Médicales du Canada) pour les subventions octroyées à mon directeur de recherche et ayant supportées l'accomplissement de mon projet de recherche.

Un gros merci à tous les membres du Centre de Recherche en Infectiologie pour l'ambiance amicale qui règne au laboratoire où ce fut un plaisir de travailler. Plus particulièrement, j'aimerais remercier chaleureusement ma collègue et grande amie Maritza Jaramillo pour tout le support moral, sa joie de vivre et son humour apportés dans les moments difficiles tout comme lors des bons moments.

Finalement, il me fait extrêmement plaisir d'honorer mes parents qui ont su exprimer les mots appropriés, poser les gestes opportuns ainsi que de contribuer financièrement à l'accomplissement de mes études. Sans leurs maints encouragements, jamais je n'aurais pu devenir la femme, la scientifique que je suis devenue. Merci pour tout!

J'aimerais préciser maintenant ma contribution à l'élaboration des articles composant divers chapitres de cette thèse. Cet apport se partage en la partie technique ainsi qu'à la partie de la conception et la rédaction des publications.

Chapitre 2

Claudine Matte and Martin Olivier. *Leishmania*-induced cellular recruitment during early inflammatory response: modulation of pro-inflammatory mediators. (soumis pour publication)

(technique: 100%; conception: 70%)

Chapitre 3

Claudine Matte, Jean-François Marquis, Philippe Gros, Robert Faure, Barry I. Posner and Martin Olivier. Peroxovanadium-mediated protection against leishmaniasis : Role of the modulation of nitric oxide. (accepté pour publication dans *European Journal of Immunology*)

(technique: 70%; conception: 50%)

Chapitre 4

Claudine Matte, Katherine A. Siminovitch and Martin Olivier. Role of phosphotyrosine phosphatases in chemokine gene regulation.

(soumis pour publication)

(technique: 100%; conception: 70%)

Chapitre 5

Claudine Matte, Grazia Mañon, Walid Mourad and Martin Olivier. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase (COX-2) in *Leishmania donovani*-infected macrophages. (soumis pour publication)

(technique: 40%; conception: 50%)

1.2.2.2	Les récepteurs de chimiokines CC.....	55
1.2.2.3	Les récepteurs de chimiokines C et CX3C.....	56
1.2.2.4	Les récepteurs autres.....	58
1.2.3	Les fonctions des chimiokines.....	60
1.2.4	Maladies inflammatoires et chimiokines.....	61
1.2.4.1	Les chimiokines et les agents pathogènes.....	61
1.2.4.1.1	Infections bactériennes et mycoses.....	62
1.2.4.1.2	Infections virales.....	65
1.2.4.1.3	Infections parasitaires.....	68
1.2.4.2	Les chimiokines et le développement de pathologies..	72
1.2.4.2.1	L'arthrite rhumatoïde.....	72
1.2.4.2.2	L'inflammation du poumon et les allergies..	72
1.2.4.2.3	Les atteintes de la peau.....	74
1.2.4.2.4	La formation de tumeurs et de cancers.....	74
1.2.4.2.5	La péritonite.....	75
1.2.4.2.6	L'athérosclérose et la maladie de Kawasaki..	75
1.2.4.2.7	La glomérulonéphrite et la néphropathie.....	76
1.2.4.2.8	La maladie coeliaque.....	76
1.2.4.2.9	Les maladies neurologiques.....	77
1.2.5	Les mécanismes de signalisation menant à l'induction des chimiokines.....	77
1.3	Buts de l'étude.....	81

CHAPITRE 2

LE RECRUTEMENT CELLULAIRE INDUIT PAR LE <i>LEISHMANIA</i> LORS DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE PRÉCOCE: MODULATION DES MÉDIATEURS PRO-INFLAMMATOIRES.....	84
2.1 Résumé.....	85
2.2 Article.....	86

CHAPITRE 3

LA PROTECTION MÉDIÉE PAR LES PEROXOVANADIUMS ENVERS LES LEISHMANIOSES : RÔLE DE LA MODULATION DU MONOXYDE D'AZOTE	125
3.1 Résumé.....	126
3.2 Article.....	128

CHAPITRE 4

RÔLE DES PHOSPHOTYROSINES PHOSPHATASES DANS LA RÉGULATION DES GÈNES DE CHIMIOKINES.....	160
4.1 Résumé.....	161
4.2 Article.....	162

CHAPITRE 5	
L'EXPRESSION DE LA CYCLOOXYGÉNASE (COX-2) INDUITE PAR LES MITOGÈNES CHEZ LES CELLULES INFECTÉES PAR LE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	190
5.1 Résumé.....	191
5.2 Article.....	192
CHAPITRE 6	
CONCLUSION.....	224
CHAPITRE 7	
BIBLIOGRAPHIE.....	240

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

BCR	Récepteur des cellules B « B cell receptor »
BLC/BCA-1	Chimioattractant des lymphocytes B « B-lymphocyte chemoattractant »
[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de calcium
CC-CR	Récepteur des chimiokines CC « CC chemokine receptor »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMSP	Cellule mononucléaire du sang périphérique
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR1/CR3	Récepteurs du complément de type 1/3 « complement receptor type- 1/3 »
CSF-1	Facteur stimulateur de colonie « Colony-stimulating factor-1 »
CXC-CR	Récepteur des chimiokines CXC « CXC chemokine receptor »
DAG	Diacylglycérol
DARC	Récepteur pour l'antigène Duffy « Duffy antigen/chemokine receptor »
ENA-78	Facteur activateur de neutrophiles dérivé de cellules épithéliales « Epithelial-derived neutrophil-activating factor-78 »
fMLP	f Met-Leu-Phe
GCP-2	Protéine granulocytaire chimiotactique « Granulocyte chemotactic protein-2 »
GM-CSF	Facteur stimulateur de croissance de macrophages/granulocytes « Granulocyte macrophage colony-stimulating factor »
gp63	Glycolipide phosphatidylinositol 63
Gro	Cytokine relié à la croissance « Growth related cytokine »
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HSV	Herpès virus
IFN-γ	Interféron-gamma
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire « intercellular adhesion molecule-1 »
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP-10	Protéine induite par IFN-γ « interferon-gamma inducible protein-10 »
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCL	Leishmaniose cutanée localisée
Ld	<i>Leishmania donovani</i>
Lm	<i>Leishmania major</i>
LM	Leishmaniose mucocutanée
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
LV	Leishmaniose viscérale
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes « Monocyte chemoattractant protein-1 »
MDC	Chimiokine dérivée du macrophage « Macrophage derived chemokine »
me/me	Souris « Motheaten »

mev/mev	Souris « Motheaten viable »
mig	Monokine induite par IFN- γ « Monokine induced by gamma-interferon »
MIP-1	Protéine inflammatoire du macrophage « Macrophage inflammatory protein »
MP	Membrane plasmique
NADPH	Phosphate de dinucléotide d'hipoxanthine nicotinamide
NAP-2	Peptide activant les neutrophiles « Neutrophil-activating peptide »
NK	Cellules « Natural killer »
NO	Monoxyde d'azote
O ₂ ⁻	Superoxyde
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PAF	Facteur activateur des plaquettes « Platelet-activating factor »
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PI3-kinase	Phosphatidylinositol (PI)-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	Leucocyte polymorphonucléaire neutrophile
PTK	Protéine tyrosine kinase
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
RANTES	« Regulated upon activation of normal T expressed and presumably secreted »
RE	Réticulum endoplasmique
SDF	Facteur dérivé des cellules stromales « Stromal cell-derived factor »
SERCA	ATPase du Ca ²⁺ du réticulum sarcoplasmic/endoplasmic « Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase »
SH2	Domaine Src homologue de type 2 « Src-homology-type-2 »
TARC	Chimiokine thymique à l'activation régulée « Thymus and activation-regulated chemokine »
TCA-3	Gène 3 de l'activation de la cellule T « T cell activation gene-3 »
TCR	Récepteur des cellules T « T cell receptor »
Tg	Thapsigargine
TGF- β	Facteur de croissance transformé bêta « transforming-growth factor beta »
TNF- α	Facteur nécrosant les tumeurs alpha « Tumor necrosis factor-alpha »
tyr	Tyrosine
VCAM-1	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires « vascular cell adhesion molecule-1 »
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: Le vecteur, Phlébotome.....	4
FIGURE 2: Cycle de vie du parasite <i>Leishmania</i>	4
FIGURE 3: La leishmaniose cutanée.....	7
FIGURE 4: La leishmaniose muco-cutanée.....	7
FIGURE 5: Les leishmanioses viscérale et post-kala-azar.....	8
FIGURE 6: Interactions des macrophages, du complément et du parasite <i>Leishmania</i>	21
FIGURE 7: Inhibition de diverses fonctions du macrophage par le <i>Leishmania</i>	25
FIGURE 8: Événements de phosphorylation et de déphosphorylation.....	30
FIGURE 9: Régulation de la signalisation.....	30
FIGURE 10: Les composés peroxovanadiums.....	35
FIGURE 11: Modèle capacitatif.....	38
FIGURE 12: Modèle capacitatif induit par le parasite <i>Leishmania</i>	41
FIGURE 13: Rôle des chimiokines dans le processus d'inflammation.....	47
FIGURE 14: La structure des 4 groupes de chimiokines.....	48

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: Systèmes antimicrobiens des macrophages.....	18
TABLEAU 2: Altérations fonctionnelles du macrophage pouvant potentiellement contribuer à l'infection intracellulaire.....	22
TABLEAU 3: La famille CXC.....	50
TABLEAU 4: La famille CC.....	52
TABLEAU 5: Récepteurs de chimiokines.....	57
TABLEAU 6: Récepteurs autres générés par les virus.....	59
TABLEAU 7: Modulation de l'expression des chimiokines par les pathogènes.....	71

Chapitre 1

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE SUR LE PARASITE *LEISHMANIA*

1.1.1 Classification du parasite *Leishmania*

Un parasite est défini comme un animal ou végétal qui doit obligatoirement se nourrir aux dépens d'un autre organisme vivant constituant son hôte, et ce, de façon permanente ou temporaire. Toutefois, ce processus ne doit pas entraîner la destruction de cet hôte.

Le parasite unicellulaire *Leishmania* fait partie de l'ordre des *Kinetoplastidae* mais on le regroupe plus précisément à l'intérieur de la grande famille des *Trypanosomatidae*. Lors de leur premier stade, ils vivent dans le sang et/ou tissus de toutes les classes de vertébrés. Cependant, au cours de leurs autres phases, on les observe dans l'intestin et les glandes salivaires d'insectes vecteurs. Ils ne possèdent qu'un seul noyau. Ils sont associés de près au kinétoplaste qui renferme l'ADN mitochondrial nécessaire à la formation des mitochondries. Le genre *Leishmania* regroupe plusieurs espèces dont *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* ainsi que de nombreuses sous-espèces (1, 2).

McNaught aurait rapporté la première description clinique d'une leishmaniose, en 1882 (1). Toutefois, ce n'est qu'en 1903 que le parasite *Leishmania* fut décrit par Leishman et Donovan. Ils l'ont observé sous sa forme ovale à l'intérieur des macrophages provenant de patients atteints de la maladie de kala-azar, en Inde (3).

1.1.2 La morphologie et le cycle répliatif du *Leishmania*

Leishmania est un parasite intracellulaire obligatoire dont la cellule hôte est le macrophage. On le distingue sous deux formes: le promastigote et l'amastigote. Le promastigote se caractérise par sa forme allongée. Il possède un flagelle, provenant du kinéosome, ce qui lui permet une certaine mobilité. Le flagelle serait aussi impliqué dans l'attachement du parasite au mur de l'intestin du vecteur (2). Le promastigote paré de son flagelle mesure de 14 à 20 μm . Au contraire, la forme intracellulaire amastigote, dépourvue de flagelle, mesure de 3 à 5 μm . Ovoïde, on retrouve l'amastigote à l'intérieur des phagocytes mononucléés (3).

La transmission du *Leishmania* s'effectue principalement par un vecteur, la mouche des sables (ie Phlébotome et Lutzomie) (voir figure 1). Les premiers à établir un lien direct entre les phlébotomes et la transmission de la leishmaniose furent les frères Sergent, en 1921. Néanmoins, ce n'est qu'en 1941 qu'Adler et Ber réussirent à démontrer la transmission du parasite par la piqûre de cet insecte (1). La mouche des sables se retrouve dans les régions chaudes tandis que dans les régions tempérées, elle n'apparaît qu'au cours de l'été pour disparaître avec l'arrivée de l'automne (1). On note l'existence de différents genres de mouches des sables transmettant des leishmanioses différentes. Ainsi, les leishmanioses du Nouveau Monde sont transmises par la piqûre des vecteurs des genres *Lutzomia spp.* et *Psychodopygus spp.* tandis que le genre *Phlebotomus spp.* propage les infections de l'Ancien Monde (4). Les chiens peuvent composer un réservoir dans certaines régions comme la Méditerranée (3).

Le cycle cellulaire du *Leishmania* se divise en deux stades majeurs (voir figure 2). Le parasite, sous sa forme promastigote principalement retrouvée chez l'insecte, pourra être inoculé à son hôte lors de la prise d'un repas sanguin. Au site d'inoculation, il pourra être internalisé par des phagocytes mononucléés. À l'intérieur de sa cellule hôte, il se métamorphosera en amastigote, non-flagellé (5). Cette forme infectieuse du parasite se multipliera par fission binaire jusqu'à ce que le cytoplasme du macrophage soit rempli. Ultiment, ces parasites s'évaderont afin d'infecter d'autres cellules pour la propagation de l'infection jusqu'aux organes cibles (3). Lors de la prise de son repas sanguin, un nouvel insecte pourra ingurgiter des cellules contenant des amastigotes directement de la

peau infectée, du sang ou des liquides tissulaires. Dans l'intestin du vecteur, ces parasites se transformeront de nouveau en promastigotes pour se multiplier. A l'aide de leur flagelle, les parasites migreront de l'intestin vers le pharynx pour finalement atteindre la bouche de la mouche afin de transmettre l'infection de nouveau (4).

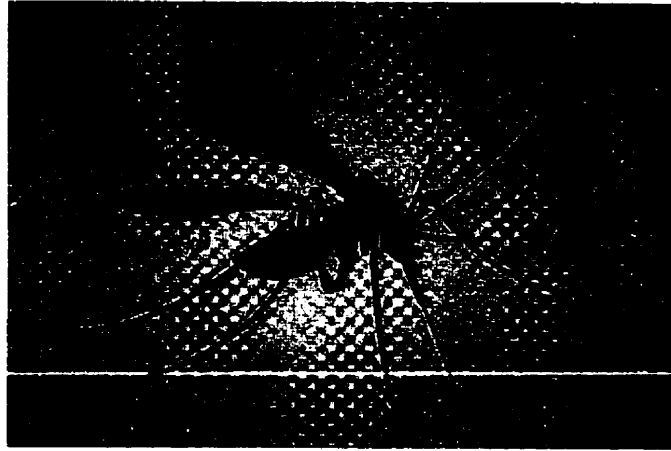


Figure 1: Le vecteur, Phlébotome
(tiré de Schmidt G.D. et L.S. Roberts, 1981)

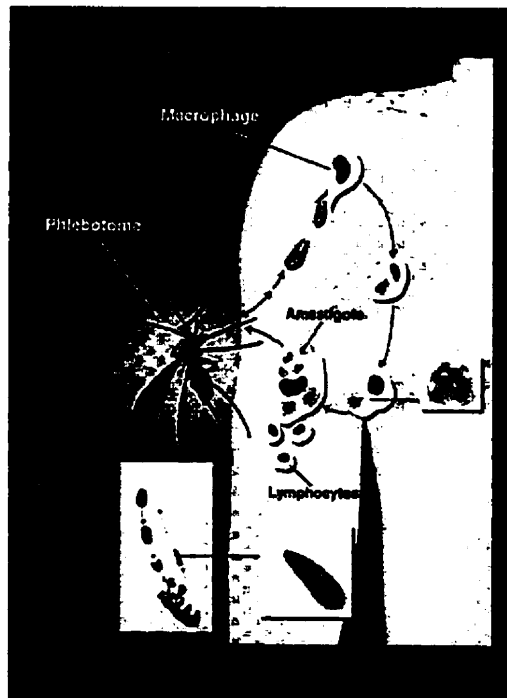


Figure 2: Cycle de vie du parasite *Leishmania*

Le phlébotome injecte le parasite promastigote dans le derme de son hôte. Lorsqu'il est phagocyté par le macrophage, le parasite se transforme en sa forme arrondie, l'amastigote. Ce dernier pourra propager l'infection.

1.1.3 Pathogénèse

La leishmaniose représente une des six principales maladies parasitaires reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (6). Il existe majoritairement trois types de pathogénèses causées lors d'une infection à *Leishmania*, variables selon l'espèce pathogène impliquée. En effet, on retrouve la leishmaniose cutanée, la leishmaniose muco-cutanée ainsi que la leishmaniose viscérale. L'atteinte cutanée est observée lors d'une infection à *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* ou *L. piruviana*. Le développement d'une lésion au site d'inoculation sous la forme d'une simple papule qui pourra s'ulcérer, caractérise la leishmaniose cutanée localisée (LCL), restreinte à des lésions bien définies de la peau. Par ailleurs, l'atteinte est souvent bénigne et auto-cicatrisante laissant une marque non pigmentée spécifique sur la peau (2, 4), dans les deux à douze mois suivant l'infection. Cette pathologie, aussi nommée le bouton d'Orient (7), démontre une réponse immune à médiation cellulaire efficace (8) (voir figure 3). L'existence de deux autres formes de leishmanioses cutanées est rapportée. Lors de la leishmaniose récidivante, les lésions possèdent un petit nombre de parasites qui affecteront de façon graduelle toute la surface de la peau. Cette atteinte peut, par la suite, provoquer la destruction de tissus sous-jacents. Au contraire, la leishmaniose cutanée diffuse (LCD) se définit par de multiples lésions nodulaires non-ulcératrices renfermant un nombre abondant de parasites disséminés dans la peau. Généralement, elle attaque le visage, les bras et les jambes, similairement à la lèpre. Cette atteinte résulterait d'une déficience de la réponse immune à médiation cellulaire (9). Cette manifestation apparaît de nombreux mois ou années suivant l'infection initiale (9) et semble réfractaire à toutes formes de thérapie (10).

L. braziliensis est l'agent causal de la leishmaniose muco-cutanée (LM), communément appelée *espundia* (7). Cette appellation péruvienne réfère à une lésion cutanée se propageant à distance par métastases (ie des macrophages migrant via la circulation sanguine). Ce type de leishmaniose serait une séquelle tardive survenant chez 1-3% des patients atteints de la LCL. L'ulcère initial peut persister ou être déjà cicatrisé lorsque ces atteintes secondaires vont faire leur apparition. Elle attaque la membrane des muqueuses du nez et de la bouche pour s'étendre à l'oropharynx et au larynx. Il en résulte des mutilations très étendues qui détruisent les cartilages et les patients meurent souvent

de complications infectieuses, particulièrement broncho-pulmonaires. On n'observe aucune guérison spontanée, au contraire la maladie évolue lentement sur plusieurs années. Néanmoins, si la cicatrisation survient naturellement suite à des traitements, les marques résultantes sont défigurantes menant à une déformation du visage (11) (voir figure 4). Ainsi, la LM est caractérisée par une réponse immune à médiation cellulaire exacerbée (12).

En plus, certaines espèces du parasite peuvent étendre leur action aux viscères. Notamment, le *L. donovani* est reconnu comme étant le principal médiateur de la leishmaniose viscérale (LV) ou kala-azar. Le parasite est phagocyté par un macrophage au site d'inoculation mais on note rarement le développement d'une lésion cutanée (13). Il migre vers ses organes cibles (principalement les cellules de Kupffer du foie, macrophages de la rate et les myélocytes de la moelle osseuse) via le flot sanguin et réticulo-endothélial (7). La maladie débute généralement avec une forte fièvre et des malaises précèdent une sévère anémie. On observe des hyperplasies de la rate et du foie conséquentes à l'infiltration massive des cellules réticulo-endothéliales (macrophages et autres phagocytes). On rapporte une défectuosité de la réponse immune à médiation cellulaire (14). Le patient devient squelettique tout en conservant un ventre volumineux (voir figure 5A). L'infection évolue lentement vers la mort sur quelques mois ou même quelques années lorsque non-traitée. Lors de cas sévères, les taux de mortalité atteignent 5-7% chez les patients ayant reçu une thérapie optimale (15). Par ailleurs, chez 5-15 % des patients, on note une guérison spontanée de leur leishmaniose (1). On remarque chez quelques patients un noircissement de la peau du front, des tempes, du contour de la bouche, de la poitrine et des jambes ce qui lui a conféré le nom de kala-azar, désignant la fièvre noire (1).

Une leishmaniose cutanée post-kala-azar peut survenir de 1-2 ans suivant l'infection viscérale et elle se caractérise par le développement de nodules non-pigmentés rougeâtres sur la peau (16) (voir figure 5B).

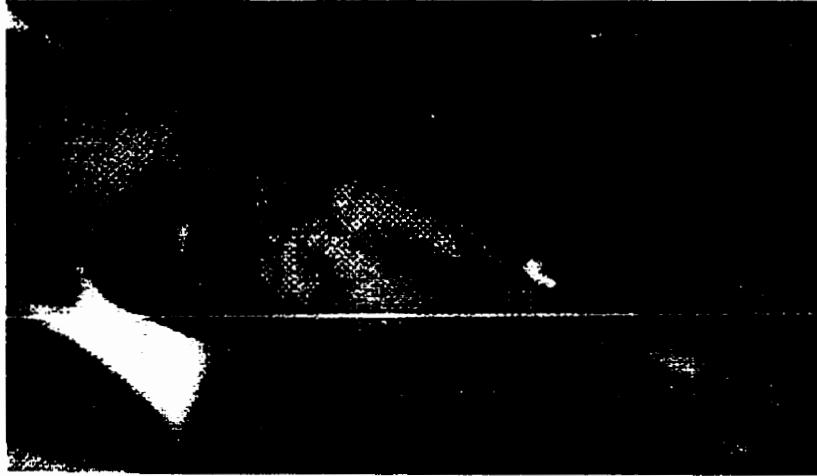


Figure 3: La leishmaniose cutanée
On note l'atteinte au niveau de la peau caractérisée par les lésions au site d'inoculation.



Figure 4: La leishmaniose muco-cutanée
On observe une atteinte au niveau des muqueuses nasales.

(tiré de Schmidt G.D. et L.S. Roberts, 1981)

A



B



Figure 5: Les leishmanioses viscérale (A) et post-kala-azar (B)
En (A) on note les hyperplasies de la rate et du foie démontrées par le gonflement de l'abdomen. En (B) on observe le développement de nodules au niveau de la peau.

(tiré de Schmidt, G.D. et L.S. Roberts, 1981)

1.1.4 Épidémiologie et incidence

Les leishmanioses touchent plus de 15 millions d'individus à travers le monde selon les rapports de l'OMS. De plus, il y a plus de 500 000 nouveaux cas qui se déclarent et approximativement 5000 morts surviennent chaque année (17, 18). L'OMS estime à plus de 350 millions le nombre total de personnes à risque de contracter une leishmaniose (19). Au cours des années 1977 et 1978, on a rapporté une épidémie de leishmaniose endémique, en Inde, qui a entraîné la mort d'environ 20 000 personnes (20). L'intérêt pour l'étude des leishmanioses est grandissant. Effectivement, la hausse des voyages dans les régions endémiques, le problème médical rencontré au cours de la Guerre du Golfe Persique ainsi que la démonstration de la leishmaniose viscérale comme une complication du syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (SIDA) en font un domaine d'intérêt (21).

Les leishmanioses se retrouvent principalement dans les régions tropicales et subtropicales (Afrique, Amérique du Sud et du Nord, Bassin Méditerranéen, Europe de l'Est et du Sud et Asie). Toutefois, la distribution locale est liée à la prévalence du vecteur spécifique (22). La LCL est diagnostiquée dans 61 pays où 200 millions de personnes sont à risque et on estime le nombre de cas à 300 000 (17). De plus, on regroupe les cas de la LV dont on dénote 100 000 cas annuellement, dans 47 pays où approximativement 200 millions d'individus sont à risque (17).

La LCL survient généralement dans les régions de la Méditerranée et de l'Afrique. Il y a plus de la moitié des cas de ce type d'infection qui survient dans les 8 pays suivants: Afghanistan, Algérie, Brésil, Iran, Iraq, Arabie Saoudite, Soudan et Syrie (17). L'infection à *L. major* touche les régions rurales où les rongeurs forment le réservoir majeur au contraire de la pathologie associée à *L. tropica* atteignant les régions urbaines où les humains composent un réservoir unique. La LM, résultante d'une infection à *L. braziliensis*, aurait comme réservoir les animaux sauvages exclusivement. Par ailleurs, il y a plus de la moitié des infections viscérales qui se déclarent dans 2 pays principalement, soit l'Inde et le Soudan (17). Récemment, une épidémie de la LV s'est déclarée en 1989 dans le sud-est du Soudan (23, 24). La guerre civile qui a éclaté en 1983, a majoritairement contribué à la transmission de cette infection, parmi les peuples Nuer et

Dinka qui ne possèdent aucune immunité. On a estimé à plus de 100 000 les décès survenus lors de cette épidémie. Néanmoins, la LV se propage aussi dans le littoral Méditerranéen, le milieu de l'Asie et l'Amérique du Sud où le réservoir se compose d'animaux domestiques (les chèvres domestiques (25), les chats (26) et principalement les chiens (27)) et les animaux sauvages (notamment les chacals (28) et les chiens ressemblant au raton laveur (29)). Au Soudan, il y a une variété d'animaux carnivores sauvages ainsi que de rongeurs (dont les rats géants et les hyrax (27)) qui constitue le réservoir endémique de cette infection (2, 7).

En général, la majorité des individus atteints de leishmanioses réside dans les régions endémiques cependant, cela n'exclut pas la possibilité de quelques épidémies. On a estimé qu'un tiers de la population mondiale vit dans les régions endémiques donc susceptible de contracter l'infection (30). En outre, on a observé une augmentation significative des taux de la LV dans les pays du sud de l'Europe qui résulterait de la hausse de l'incidence du SIDA où la LV est classée comme une infection opportuniste (31, 32).

1.1.5 Traitement

La réussite de la thérapie employée pour les leishmanioses s'accompagne très souvent d'une leishmaniose cutanée persistant de longs mois (3). Par ailleurs, il y a plusieurs éléments qui influencent directement la réussite de la thérapie dont le traitement utilisé en soi, le stade de la maladie (les cas très avancés réagissent peu à la thérapie), la malnutrition ainsi que l'altération de la réponse immune à médiation cellulaire rencontrée lors de rechute (33).

Dès 1912, on a utilisé les antimoinés organiques pour traiter les leishmanioses. Le sodium stibogluconate, un antimoine pentavalent (Penstostam), fut le premier composé à être reconnu pour son efficacité clinique, en 1947. De nos jours, la thérapie pour toutes les formes de leishmanioses repose encore sur l'utilisation du stibogluconate et de l'antimoine meglumine (Glucantime) (34, 35). Néanmoins, avec le traitement intensif des leishmanioses, il y eut l'apparition de résistance face aux antimoinés pentavalents. Effectivement, il y aurait plus de 5% des patients atteints de la LV qui développent une

résistance à l'administration de ces composés et en conséquence, meurent (36). Ainsi, afin de contrecarrer ce problème majeur, la formation de nouveaux composés et la recherche de nouvelles approches immunologiques furent entamées. Notamment, la pentamidine qui endommage le complexe kinétoplaste-ADN mitochondrial, est prescrite dans les cas de résistance lors du traitement de la maladie de kala-azar. Cependant, elle est plus toxique que les antimoinés (37). De plus, une autre alternative fut l'élaboration de l'amphotéricine B et ses lipides associés. La cible de cette drogue est un stérol « ergosterol-like » qui représente le stérol majeur composant la membrane du parasite ce qui entraîne la rupture de cette dernière (38). Ainsi, l'amphotéricine B apparaît être une excellente drogue de second choix pour le traitement des LCL et LM réfractaires aux antimoinés. La monothérapie pour la LV utilisant la paromomycine semble être efficace. Toutefois, elle est moins puissante que les antimoinés pentavalents. De plus, comme elle est un aminoglycoside, elle peut potentiellement provoquer de sérieux effets secondaires incluant la toxicité rénale et la toxicité du 8^{ième} nerf crânien (39).

La leishmaniose cutanée permet l'utilisation de certaines techniques physiques dont le curettage, l'irradiation, la chaleur locale ainsi que la congélation. En plus, l'ajout d'agents topiques sur les lésions (paramomycine, antimoinés pentavalents, mepacrine) aurait une certaine efficacité (40, 41).

La facilité d'administration d'un traitement oral a intéressé plusieurs essais cliniques. Ainsi, la mise en évidence d'une activité anti-leishmaniale chez des agents administrés oralement fut reporté pour le kétoconazole, le plus vieil agent clinique de la famille des imidazoles qui inhibent la biosynthèse des ergostérols (42). Néanmoins, son action est variable selon les différentes espèces de *Leishmania* impliquées (43).

Donc, malgré l'élaboration de ces nouvelles drogues, le traitement de leishmanioses constitue toujours un problème de taille dû à l'utilisation limitée de ces composés à cause de leur grande toxicité et une administration difficile. Depuis quelques années, les recherches misent sur un traitement alternatif reposant sur la capacité d'intensifier la réponse du système immunitaire envers le parasite en administrant diverses cytokines recombinantes. Badaro et collègues (44) furent les premiers à combiner la thérapie d'antimoine avec l'IFN- γ recombinant humain pour traiter la LV. L'IFN- γ est

connu pour augmenter la capacité antimicrobicide du macrophage envers plusieurs pathogènes (45). Leur étude rapporte que 7 patients sur 9, au départ résistants à l'antimoine, furent guéris par la combinaison d'IFN- γ et d'antimoine. Les études portant sur l'utilisation de l'IFN- γ recombinante démontrent que cette cytokine n'est pas suffisamment active pour être utilisée seule et que par ailleurs, elle provoque certains effets secondaires. Notamment, on a observé une fièvre quotidienne, des maux de tête, une leucopénie et une éosinophilie. De plus, deux patients sont décédés des conséquences d'une anémie, une attaque cardiaque et de vomissements intractables. Toutefois, l'efficacité de l'IFN- γ est augmentée lorsqu'on l'administre en combinaison avec des antimoinés pentavalents (46, 47). De plus, l'utilisation d'IL-2 recombinant pour le traitement de la LCD réduit significativement la charge parasitaire locale chez des patients atteints de cette infection (48). Par ailleurs, l'efficacité du GM-CSF recombinant humain dans la thérapie envers la LV (49) repose aussi sur la capacité de ce composé à augmenter l'activité microbicide du macrophage envers le *Leishmania*.

Par ailleurs, un système « suicide » basé sur la combinaison de la thymidine kinase-ganciclovir a été testé lors de la LC expérimentale chez des souris BALB/c (50). Ce traitement à ganciclovir résulte en l'inhibition complète des parasites intracellulaires chez les souris traitées aux jours 1 à 4 suivant l'infection, reflétée par le contrôle de l'infection à long terme (2 semaines suivant l'infection).

L'élaboration d'un vaccin anti-leishmaniose semble être imminente. Armijos et collègues (51) ont développé un vaccin composé de trois souches différentes de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. guayanensis* et *L. amazonensis*). Les parasites furent tués par un traitement au phénol puis dilués dans un adjuvant de BCG (bacille de Calmette-Guérin). Suite à deux doses intra-dermales du vaccin (un mois d'intervalle) chez des enfants âgés en moyenne de 5 ans, l'incidence de la LCL, après 12 mois de suivi, est moins élevée par rapport au groupe contrôle. En effet, leur vaccin semble conférer une protection anti-leishmaniose à 73%. Les seuls effets secondaires attribués à cette vaccination consistent en une fièvre de bas degré ainsi qu'une microlymphoadénopathie. Donc, ces résultats sont prometteurs et indiquent que la préparation d'un vaccin anti-leishmaniose est sur la bonne voie.

1.1.6 Immunologie des leishmanioses

Lors d'une invasion parasitaire, le système immunitaire de l'hôte essaie de bloquer la propagation de l'infection en déployant ses multiples moyens de défense. Ainsi, les patients manifestent une réponse immune humorale (production d'anticorps) ainsi que cellulaire (les cellules T et les macrophages) contre l'invasion par le *Leishmania*. Les anticorps dirigés contre les antigènes du parasite sont difficilement détectables chez des patients atteints de la LCL et on les trouve en bas titres lors de la LM. Au contraire, la LV induit un titre très élevé de ces anticorps qui toutefois, ne confèrent pas de protection contre l'infection. En effet, la réponse humorale ne démontre pas une grande efficacité envers les parasites intracellulaires comme le *Leishmania* car lorsque le parasite a pénétré la cellule hôte, il est protégé de l'action des anticorps (5). Cependant, les anticorps peuvent endommager directement les parasites extracellulaires et augmenter leur élimination par les phagocytes à l'aide du complément. Par conséquent, les défenses de l'hôte reposent essentiellement sur la réponse immune à médiation cellulaire. Cette dernière regroupe différents types de cellules effectrices qui participent à la défense de l'hôte envers l'infection en contrôlant la multiplication et la dissémination des parasites. Leurs activités anti-leishmaniales sont induites par l'action de diverses cytokines libérées en réponse à l'infection.

Il existe des souris (dont BALB/c) qui développent une maladie cutanée ainsi que viscérale. Dans certains cas, elles meurent suivant une infection à *L. tropica* ou *L. major* tandis que d'autres souris (C57BL/6) guérissent spontanément de leurs lésions cutanées. Ces modèles expérimentaux de leishmanioses chez les rongeurs ont permis d'accumuler des informations importantes concernant ces pathologies et pourraient potentiellement permettre l'élaboration de nouvelles approches immunologiques afin de contrôler ces maladies chez l'homme. Toutefois, comme pour plusieurs modèles animaux lors de maladies infectieuses, on n'a pu déterminer jusqu'à quel point ces systèmes rejoignent les pathologies observées chez l'homme.

La peau est le premier organe touché lors de l'infection à *Leishmania*, par la piqûre du vecteur. De plus, elle représente une composante importante de notre système de défense. Elle renferme des cellules immunocompétentes incluant les deux types majeurs

de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (les cellules de Langerhans et les kératinocytes) ainsi que les cellules T épidermales. La portion du derme périvasculaire, quant à elle, se compose de cellules endothéliales, péricytes, cellules T, mastocytes et fibroblastes dermaux et contient des cytokines/chimiokines interagissantes (52, 53). Les cellules non-hématopoïétiques (incluant les fibroblastes dermaux, les cellules endothéliales, les kératinocytes épidermaux et les mélanocytes) par leur capacité à produire diverses cytokines (revu en 54), peuvent indirectement retenir les leucocytes requis dans la microvascularisation à des sites anatomiques précis, les guider à travers les parois des vaisseaux sanguins ainsi que le tissu dermal à l'aide d'un gradient chimiotactique pour finalement les activer *in situ* (54, 55).

La cascade d'événements qui survient lors de la réaction inflammatoire dans la peau, varie selon les différentes leishmanioses. La guérison est associée avec le bon fonctionnement de la réponse immune cellulaire alors que la prolongation de la maladie est reliée avec l'absence/altération de cette réponse. Lors de la LCL expérimentale (ie souris BALB/c), on a relié la réponse immune efficace/protectrice à une réponse T_H1 (les cellules T génèrent la production d'IFN- γ (56) et de TNF- α (57)) tandis que la réponse T_H2 (les cellules T libèrent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10) (58, 59) est associée à une réponse inefficace résultant en la propagation et l'exacerbation de l'infection (60, 61).

Lima et collègues (62) ont rapporté une infiltration massive de PMN (leucocytes polymorphonucléaires) dans le derme lors des premières 48-72 heures suivant l'inoculation de *L. major* ou *L. amazonensis*. Leur étude démontre que les neutrophiles représentent le type cellulaire dominant au cours des trois premiers jours de l'infection. Ils notent aussi la présence d'éosinophiles qui sont variables en nombre selon l'espèce de *Leishmania*. Ainsi, ils suggèrent que ce recrutement précoce de neutrophiles pourrait jouer un rôle important dans la propagation de l'infection en réduisant le nombre de parasites au site d'inoculation afin de contrôler l'étalement systémique du *Leishmania* et de protéger l'hôte. Par la suite, la population de monocytes/macrophages augmente pour représenter l'infiltrat cellulaire dominant, qualifié pour instaurer avec les cellules T une réponse immune spécifique efficace. Néanmoins, ces mêmes monocytes/macrophages servent de cellules hôtes permettant au parasite de se propager.

Lors de la LCL, on observe une réponse inflammatoire active avec une hausse des cellules de Langerhans (8) où les cellules conduisent au développement d'une réponse T_H1 caractérisée par la production des cytokines IFN- γ et TNF- α . On note aussi l'expression d'IL-1 β , d'IL-8 et d'IL-10 chez des souris BALB/c et C57BL/6 infectées ainsi que chez des patients atteints de la LCL (8, 63). Cependant, chez ces derniers, une faible ou inexistante expression d'IL-2, d'IL-3, d'IL-4 et d'IL-5 a été observée (63). Plus précisément, il semble que les lésions chroniques (> 4 mois) ainsi que les lésions précoces (< 2 mois) de la LCL induisent une même production d'IFN- γ alors que les lésions chroniques renferment un plus haut taux d'IL-10 (63). La production de quelques chimiokines, d'importants médiateurs de l'inflammation reconnus pour attirer les cellules compétentes au site d'infection, a aussi été évaluée dans les lésions de leishmanioses. Ritter et collègues (64) ont associé la LCL avec la libération de la MCP-1 qui entraînerait la stimulation des mécanismes microbicides du macrophage tandis que la MIP-1 α est majoritairement sécrétée lors de la LCD. De plus, chez les nodules lymphoïdes de souris C57BL/6, résistantes à l'infection à *L. major*, Vester et collègues (65) ont observé une hausse de l'expression de l'ARNm d'IP-10, de la MCP-1 et de la lymphotactine. Leurs résultats suggèrent que ces chimiokines pourraient augmenter l'activité des cellules NK et en conséquence, entraîneraient un contrôle de l'infection.

La LM est caractérisée par une réponse immune exacerbée où il y a un dysfonctionnement des CPAs. L'abondance des ARNm des cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 et IL-10 dans les lésions cutanées résulterait de l'induction d'une réponse mixte T_H1/T_H2 (66, 67). Ces résultats suggèrent en conséquence que l'IL-4 produite par les cellules T_H2 pourrait induire la prolifération de ces mêmes cellules T_H2 et en plus, elle résulterait en la sécrétion d'IL-10. Au contraire, la production d'IFN- γ observée viendrait empêcher l'IL-4 d'être totalement active en contrecarrant en partie son action. Une anergie sélective et l'anormalité des CPAs composent les éléments clés de la LCD où on rapporte une faible production de TNF- α et d'IL-1 β indiquant un manque dans la production des cytokines par les CPAs (67). Cependant, on a observé une augmentation de la réponse T_H2 caractérisée par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 (67).

En ce qui concerne l'infection viscérale, une étude a fait l'analyse chez des cellules mononucléaires, provenant de patients atteints de la LV expérimentale, de l'expression de l'ARNm de plusieurs cytokines T_H1/T_H2 . Ces résultats montrent une forte expression de des ARNm de l'IFN- γ et de l'IL-10 alors que l'ARNm de l'IL-4 est indétectable (69). De plus, l'étude de la moelle osseuse et des nodules lymphoïdes montre la présence d'IFN- γ et d'IL-10 dans les lésions d'une LV aiguë. Cette étude menée par Karp (69) ainsi que celle de Ghalib (70) suggèrent que cette expression d'IL-10 lors de la LV contribuerait au développement de la pathogénèse en inhibant l'activation du macrophage nécessaire pour le contrôle de l'infection car l'IL-10 est reconnu pour ses puissantes capacités inhibitrices de la fonction anti-leishmaniale du macrophage.

Récemment, Cotterell et collègues (71) ont rapporté que chez des souris BALB/c infectées avec des amastigotes de *L. donovani*, il y avait une expression rapide, dès 5 h post-infection, des gènes de MCP-1, de MIP-1 α et d'IP-10 dans les foies infectés. Cette première induction de chimiokines, indépendante des cellules T, ne semble pas suffisante pour permettre l'inflammation. Néanmoins, ils ont aussi observé une expression d'IP-10 persistante au-delà de 7 jours, consécutive à l'action des cellules T. Cette élévation prolongée d'IP-10 représenterait l'élément chimiotactique essentiel permettant l'élaboration du granulome caractéristique chez ces souris infectées.

En somme, diverses études suggèrent que les différents types de leishmanioses semblent moduler spécifiquement la production de cytokines et chimiokines selon le type cellulaire impliqué (T_H1/T_H2) afin d'induire le développement de leur pathologie respective.

1.1.7 Atteintes du macrophage, la cellule hôte

1.1.7.1 L'activation du macrophage

Le parasite *Leishmania* est phagocyté obligatoirement par sa cellule hôte, le macrophage, lors de l'infection. Le macrophage est incapable de résister à l'invasion parasitaire lorsqu'il est au repos. Toutefois, l'activation du macrophage lui fournit la capacité de reconnaître et détruire les agents pathogènes envahissants incluant le *Leishmania* ainsi que les tumeurs (5). Son activation est caractérisée par une hausse de

son activité phagocytaire, de ses fonctions immunorégulatrices (l'apprêtement et la présentation de l'antigène), de la production du superoxyde (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de monoxyde d'azote (NO)) (72) et de sa fonction de sécrétion (libération de cytokines, protéases et anti-protéases, composants du complément et métabolites de l'acide arachidonique) (73, 74, 75). Les cellules T, en libérant une variété de cytokines (IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ , TNF- α/β , GM-CSF) (74, 76, 77), provoquent l'activation du macrophage où l'IFN- γ manifeste la plus grande efficacité (78). Toutefois, un tel processus peut être supprimé par l'action de molécules régulatrices notamment la PGE_2 (73). Ainsi, la résistance envers le *Leishmania* est reconnue pour être médiée par la réponse immune cellulaire de l'hôte dont résulte l'activation du macrophage conduisant à l'induction de son activité leishmanicide (79).

Le processus d'activation du macrophage se définit en quatre étapes précises: 1- la reconnaissance par la cellule d'un signal extracellulaire suite à une liaison ligand-récepteur; 2- menant à un déclenchement d'événements de signalisation transmembranaire impliquant la participation d'un ou plusieurs messagers secondaires; 3- suivi de l'action de ces messagers secondaires dans le cytoplasme et le noyau; 4- conduisant à l'expression de certains gènes résultant de l'activité de facteurs de régulation transcriptionnelle dans le noyau. En conséquence, grâce à leur activation, les macrophages sont aptes à déclencher plusieurs mécanismes leur permettant de combattre l'invasion du parasite (74). On regroupe en deux catégories principales les défenses microbicides du macrophage (revu en 80): 1- le système dépendant de l'oxygène; 2- le système indépendant de l'oxygène (voir tableau 1).

Tableau 1: (traduit de Reiner, N.E., 1994)

Systèmes antimicrobiens des macrophages

Système	Mécanisme
<u>Dépendant de l'oxygène</u> * Explosion respiratoire * Production de NO à partir de l'arginine	assemblage et activation de l'oxydase dépendante de NADPH catalysée par NO synthase dépendante de NADPH
<u>Indépendant de l'oxygène</u> * pH * Enzymes lysosomales * Privation en nutriments • Défensines * Autres protéines antimicrobiennes	acidification de la vacuole fusion phagolysosome séquestration du fer/ dégradation du tryptophane perméabilité cellulaire et formation de canaux indéterminé

Le premier système réfère à la production de composés toxiques pour le parasite, soit les réactifs intermédiaires de l'oxygène médiés par l'explosion respiratoire du phagocyte ainsi que les réactifs intermédiaires de l'azote (81). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le système indépendant de l'oxygène, incluant l'acidification de la vacuole phagolysosomale, l'action hydrolytique de diverses enzymes lysosomales, la privation de différents nutriments essentiels dont le fer, l'action des défensines et des autres protéines microbicides (82, 83).

1.1.7.2 Actions du *Leishmania* sur le macrophage

Le parasite *Leishmania* a développé divers mécanismes afin de contrecarrer les différentes défenses du système immunitaire, plus particulièrement celles du macrophage, pour assurer sa survie. En effet, le parasite doit survivre dans sa cellule hôte pour permettre la propagation de son infection. Il y a deux principales molécules recouvrant la majeure partie de la surface du parasite: le lipophosphoglycan (LPG) et la molécule gp63. D'ailleurs, elles recouvrent près de 45% de la surface du promastigote et elles sont aussi retrouvées chez l'amastigote ainsi que le macrophage infecté (84). Le LPG, retrouvé à plus de 6×10^6 molécules/parasite (85), est composé de quatre parties distinctes: un « cap » oligosaccharide spécifique à chaque espèce de *Leishmania*, un polymère de répétitions d'unités saccharides phosphorylées, un noyau carbohydrate ainsi qu'une ancre lipidique phosphatidylinositol afin de le maintenir dans la membrane du parasite (revu en 86, 87). La protéase gp63, elle aussi retrouvée en très grand nombre à la surface du parasite ($\sim 10^7$ molécules/parasite), se compose de glycolipides phosphatidylinositol glycosylés (GPI) (85) qui lui permettent de s'ancrer dans la membrane du parasite.

Le parasite s'est adapté à son hôte, notamment en développant une résistance face à l'action des molécules du complément (88, 89) et ce, apparemment grâce à l'action de sa molécule gp63 (90). En outre, le parasite se séquestre de lui-même dans sa cellule hôte afin d'éviter l'action des anticorps circulants. Ainsi, la membrane cytoplasmique du phagocyte constitue une barrière infranchissable contre les produits immuns solubles car il n'y a aucune détection possible du parasite lorsque ce dernier est à l'intérieur du phagocyte (91). En plus de se protéger contre les défenses de sa cellule hôte, le

Leishmania s'assure que cette dernière demeure entière tout au long de son processus de multiplication et d'infection afin d'utiliser cette cellule comme abri/nutriments. Effectivement, le parasite *L. donovani* empêche la destruction de sa cellule hôte en inhibant le programme de suicide cellulaire nommée apoptose (92) car la mort de sa cellule hôte entraînerait en conséquence sa disparition, donc la fin de l'infection.

1.1.7.2.1 La phagocytose

Le phénomène de phagocytose permet au parasite de pénétrer de façon passive dans le macrophage (5). Il y a de multiples récepteurs responsables de l'attachement et de la capture des promastigotes qui se retrouvent à la surface de la cellule hôte soit les récepteurs du complément de type 1 et 3 (CR1, CR3), le récepteur du mannose-fucose, le récepteur de la fibronectine, le récepteur du macrophage pour les produits finaux de glycation avancée ainsi que plusieurs molécules de surface du parasite (LPG, gp63). Cette interaction entre le parasite et la cellule hôte peut s'effectuer par une liaison directe ou indirecte, via des molécules sériques dérivées de l'hôte/associées au parasite telles C3b/C3bi du complément, la fibronectine et la protéine C réactive (93-96) (voir figure 6).

1.1.7.2.2 *Leishmania* dans le macrophage

Dès son contact avec le macrophage, le *Leishmania* altère plusieurs fonctions du phagocyte, en conséquence, il y a une désactivation et une inhibition fonctionnelle du macrophage (voir tableau 2; figure 7).

Tableau 2: (traduit de Reiner, NE. 1994)

Altérations fonctionnelles du macrophage pouvant potentiellement contribuer à l'infection intracellulaire

Diminution	Augmentation
<ul style="list-style-type: none"> * Transcription des gènes de CMH classe II * Apprêtement et présentation de l'antigène * Production de diverses cytokines (TNF, IL-1) * Expression de protéines régulatrices de la transcription (c-fos) * Activité de l'explosion respiratoire * Phagocytose * Activité microbicide 	<ul style="list-style-type: none"> * Production de molécules immunosuppressives (PGE₂, TGF-β, IL-10)

Une fois internalisé, le pathogène doit résister à l'environnement acide et riche en protéases dépendant du métabolisme oxydatif qui est retrouvé dans le phagolysosome, afin de ne pas être détruit et de permettre sa transformation en amastigote. Une variété de molécules (LPG, gp63, GPIs (glycoinositolphospholipides), GSLs (glycosphingolipides)), exprimées différemment à la surface du promastigote et de l'amastigote, contribuerait à favoriser cette survie intraphagolysosomale. L'étude menée par Desjardins (97) a montré le rôle du LPG dans l'inhibition de la fusion endosome-phagosome en utilisant des parasites *L. donovani* mutants C3PO qui sont déficients en LPG à leur surface. L'infection de macrophages avec ces parasites mutants a permis la fusion phagolysosomale contrairement à l'inhibition observée par l'ajout de parasites entiers. De plus, l'opsonisation des parasites C3PO avec la molécule LPG purifiée restaurait cette inhibition. De surcroît, le LPG combat efficacement les radicaux d'hydrogène et les anions superoxydes qui sont rapidement libérés suivant l'activation de la NADPH oxydase lors de la phagocytose (98, 99). D'autres chercheurs rapportent que l'activité de la protéase gp63 pourrait aussi protéger les parasites de cette cytolysse intraphagolysosomale (93). De par l'inhibition intraphagolysosomale, le parasite gagne du temps afin de permettre sa transformation en sa forme amastigote, considérée être plus résistante envers les enzymes et le pH acide du phagolysosome.

De plus, le parasite peut supprimer la production de molécules anti-leishmaniales appartenant au système dépendant de l'oxygène. L'infection des macrophages humains ou murins avec *L. major* ou *L. donovani* amène une réduction significative de la production d' O_2^- et de H_2O_2 stimulée par les esters de phorbol (101, 102, 103). En outre, l'activation de la protéine kinase C (PKC) et sa translocation du cytosol à la membrane forment des éléments essentiels pour l'induction de l'explosion respiratoire du macrophage (104, 105). Néanmoins, la partie carbohydrate du LPG (phosphoglycan) ainsi que le parasite total sont reconnus pour inhiber l'activité de la PKC et sa translocation ce qui supprime en conséquence l'explosion respiratoire du phagocyte (revu en 103, 106). Aussi, on associe cette suppression de l'explosion respiratoire à l'action de la protéase gp63 (107).

La production de NO est associée avec une résistance marquée des cellules murines envers le *Leishmania* (108, 109). Evans et collègues (110) ont mesuré une hausse

de la synthèse de NO chez des souris C3H/HeN, résistantes génétiquement à l'infection à *Leishmania*, en réponse à *L. major*. Ainsi, la synthèse de NO par la L-arginine représente un mécanisme anti-leishmanial efficace. Toutefois, le *Leishmania* a développé la capacité d'affecter ce processus. Cette suppression de la voie de la monoxyde d'azote synthase par le parasite survient seulement lors de la phase précoce de l'infection lorsque les cytokines, dérivées de cellules T (telle l'IFN- γ), stimulent les cellules hôtes infectées. En effet, les études menées par Proudfoot et collègues (111, 112) ont démontré que chez des macrophages murins l'ajout de GIPLs, LPG ou de parasite *L. major* entier, 4 à 18 h avant la stimulation à l'IFN- γ , résultait en une forte inhibition de l'induction d'iNOS-2 alors qu'une addition simultanée amenait une induction d'iNOS-2, conséquente à une synergisation des composantes du parasite et de l'IFN- γ .

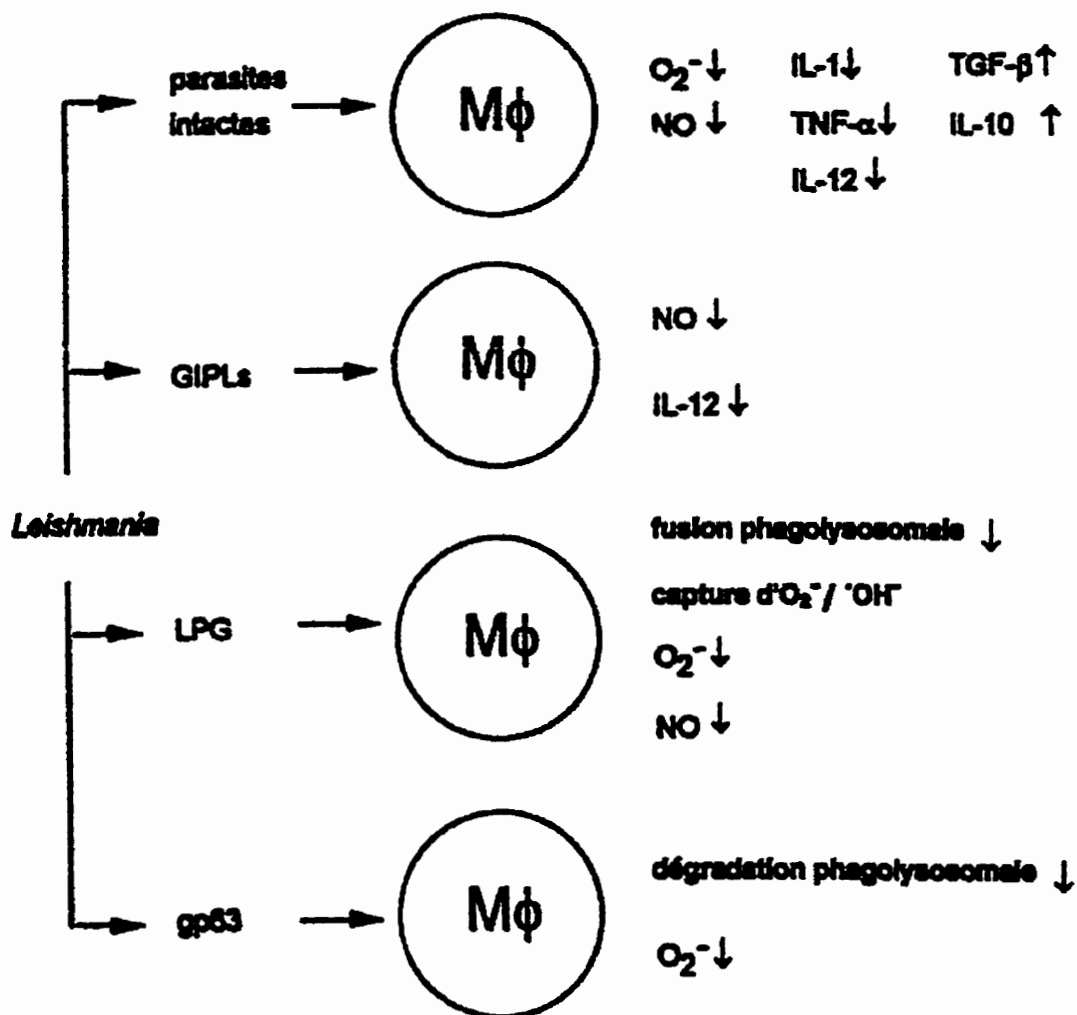


Figure 7: Inhibition de diverses fonctions du macrophage par *Leishmania*
(traduit de Bodgan C. et M. Rollinghoff, 1998)

Les diverses molécules du *Leishmania* (GIPLs, LPG, gp63) et le parasite entier affectent diverses fonctions de défenses du macrophage.

1.1.7.3 La réponse immune dépendante des cellules T

Le système immunitaire requiert aussi la participation des cellules T dans la défense anti-leishmaniale. Les cellules T CD4⁺ (cellules T effectrices) peuvent se diviser en deux groupes majeurs selon la production de leurs cytokines spécifiques. Comme il a déjà été mentionné auparavant, les cellules T CD4⁺ T_H1 mènent à l'instauration de l'immunité à médiation cellulaire grâce à la libération d'IFN- γ (113), d'IL-2 (114), d'IL-3 (115), d'IL-12 (116), de GM-CSF (117) et de TNF- α (118). Ceci permet l'élaboration d'une immunité protectrice permettant de résister à l'infection par l'activation de divers mécanismes de défense. Au contraire, les cellules T CD4⁺ T_H2 génèrent la libération d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, associées principalement à une réponse médiée par les cellules B (114). Cette réponse résulte en la susceptibilité de l'hôte face au parasite ce qui conduit à la propagation de l'infection.

Les diverses fonctions des cellules T seraient aussi modulées par les métabolites de l'acide arachidonique, notamment la PGE₂, produits par les macrophages (119). En effet, la PGE₂ est reconnue pour ses fonctions immunoinhibitrices et l'étude menée par Milano et collègues (120) associe la production de la PGE₂ avec le développement de la LCL. L'infection de souris BALB/c avec le *L. major* conduit à une hausse de la production de la PGE₂ par les cellules de la rate des souris, suivant 1 semaine d'infection. Les souris traitées à l'indométhacine, un inhibiteur connu de la production de la PGE₂, ont une diminution drastique de leurs lésions métastatiques (121). De plus, on a rapporté qu'une infection à *L. donovani* conduit à une augmentation significative du taux de la PGE₂ et en conséquence, il en résulte une réponse cellulaire T_H2 accompagnée de l'altération de diverses fonctions du macrophage (122-124). L'induction d'une autre cytokine immunoinhibitrice, le TGF- β , a été démontrée chez des macrophages infectés par *L. v. braziliensis*, *L. mexicana* et *L. major* (125). Son expression est augmentée significativement dans les lésions de patients atteints de la LCL chronique (60). Le TGF- β est effectivement reconnu pour contrer l'activation du macrophage induite par l'IFN- γ (126). En outre, l'exacerbation de l'infection en présence du TGF- β pourrait s'expliquer par sa capacité à libérer les cytokines T_H2, telles l'IL-4 et l'IL-10 (125, 127).

En réponse à l'infection, les macrophages sont incapables de produire certaines cytokines stimulatrices des fonctions des cellules T. En effet, les macrophages humains ou murins infectés par le *L. donovani* montrent une production diminuée d'IL-1 en réponse à une stimulation au LPS ou aux *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (128-130). Hatzigeorgiou et collègues (131) ont montré que le LPG inhibe la transcription du gène d'IL-1 β induite par le LPS chez des monocytes humains, en agissant au niveau d'une séquence promotrice du gène (région contenant les nucléotides -310 à -57) qui fonctionnerait en conséquence comme un gène silencieux. Au contraire, la cytokine TNF- α , connue pour sa capacité à agir en synergie avec l'IFN- γ afin de hausser l'activité microbicide du macrophage (57), est produite chez les souris BALB/c infectées par le *L. donovani* (132). De plus, chez des patients atteints de la LV, on observe des taux circulants élevés de TNF- α (133, 134). Néanmoins, des études *in vitro* menées par Descoteaux et Matlashewski (135) ont démontré que des macrophages murins infectés par le *L. donovani* ont une réduction significative de l'accumulation de l'ARNm du TNF- α en réponse à une stimulation au LPS. De plus, cette altération de l'expression du gène de TNF- α par le *Leishmania* serait un mécanisme dépendant de la production de la PGE₂. Cette dernière, reconnue pour réduire la transcription du gène de TNF- α en réponse au LPS (136), est aussi produite lors d'une infection par le *L. donovani* (108).

La cytokine IL-12 qui induit la réponse T_{H1} chez les cellules en favorisant la production d'IFN- γ (116), serait affectée par l'infection à *L. major*. Des macrophages humains ou murins mis en présence de ce parasite montrent une libération réduite d'IL-12 en réponse à l'IFN et au LPS (137) ou *S. aureus* (138). La molécule phosphoglycan du LPG serait responsable de cette diminution (139).

De surcroît, le *Leishmania* peut agir au niveau de l'apprêtement (« processing ») et de la présentation de l'antigène ainsi qu'au niveau de la stimulation des cellules T. Cette activation des cellules T nécessite l'expression à la surface cellulaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, l'interaction ligand-récepteur (B7/CD28; CD40/CD40L; CMH classe II/CD4) et la présentation du peptide par la molécule de CMH de classe II (revu en 140). Il a été démontré que l'expression de la molécule de CMH de classe II était inhibée en réponse à l'IFN- γ chez les macrophages

murins infectés par *L. donovani* (141). De Souza-Leao et collègues (142), selon leurs études immunocytochimiques, suggèrent que les amastigotes intracellulaires de *L. mexicana* internalisent et dégradent les molécules de CMH classe II dans la vacuole parasitophore des macrophages murins. De plus, il a été démontré que contrairement à d'autres microorganismes, le *L. donovani* n'induit pas l'expression des molécules B7-1 à la surface des macrophages infectés (143). On a aussi montré que la molécule CD4 à la surface des cellules T humaines était coupée sous l'action de la protéase gp63 des parasites *L. major* et *L. donovani* ce qui entraîne la déstabilisation de l'interaction entre la CPA et la cellule T effectrice (144). En effet, cette interaction dépend entièrement de la liaison entre les molécules de CMH classe II et B7 à la surface des CPAs avec leurs ligands exprimés chez les cellules T effectrices, soit les molécules CD4 et CD28, respectivement.

Ainsi, l'activation des cellules T effectrices spécifiques envers le parasite nécessite la disponibilité des peptides dérivés du parasite pour leur présentation sur les molécules de CMH de classe II, en plus de la présence des molécules du CMH de classe II et des molécules costimulatrices. Cependant, il semble que, suivant sa pénétration dans sa cellule hôte, les antigènes des amastigotes de *Leishmania* soient retenus dans la voie du CMH de classe II lors de la présentation de l'antigène. Cette séquestration résulterait d'un manque de molécules de CMH de classe II possiblement dégradées par les amastigotes ou d'un blocage du transport du complexe peptide-molécule de CMH de classe II vers la membrane cellulaire. Ce mécanisme d'évasion permet au parasite de persister dans la cellule hôte en contrecarrant l'activation des cellules T CD4+ (145).

1.1.7.4 La signalisation intracellulaire du macrophage

La signalisation intracellulaire chez le macrophage joue un rôle pivot dans le processus régulant diverses fonctions d'activation. Suite à la liaison d'un ligand (cytokines, peptides/antigènes ou hormones) avec son récepteur spécifique à la surface du macrophage, ce dernier perçoit le signal extracellulaire puis active une cascade d'événements biochimiques complexes.

1.1.7.4.1 La signalisation dépendante des protéines tyrosines kinases/phosphatases:

L'étude des mécanismes moléculaires menant à la transduction de signaux a permis la découverte du phénomène de la phosphorylation. En effet, il y a plus de 40 ans, la phosphorylation ainsi que la déphosphorylation enzymatiques des protéines ont été mises en évidence (146, 147). L'événement de la phosphorylation des protéines sur leurs résidus tyrosine (tyr) ou sérine/thréonine (ser/thr) représente un important mécanisme pour la transmission de la signalisation de la surface cellulaire au noyau afin de contrôler divers processus physiologiques dont la croissance, la différenciation, le développement cellulaire et les fonctions du cytosquelette (148). Le processus de phosphorylation est réversible. Plus particulièrement, le contenu des protéines cellulaires en phosphotyrosine reflète l'activité des phosphotyrosines kinases (PTKs) catalysant la phosphorylation ainsi que des phosphotyrosines phosphatases (PTPs), responsables de la déphosphorylation des résidus tyrosine. Selon le contexte cellulaire, ces deux types d'enzymes peuvent antagoniser ou coopérer l'une avec l'autre lors de la transmission de signaux. En conséquence, les PTPs peuvent aussi agir négativement afin de contrecarrer les événements signalétiques induits par les PTKs, *in vivo* (voir figure 8).

Toutefois, ces mêmes PTPs peuvent promouvoir positivement des mécanismes de la signalisation *in vivo* car la déphosphorylation de l'activité kinase peut déclencher la cascade de signalisation comme une étude l'a reporté pour la signalisation chez la cellule T dépendante de la molécule CD45 (149) (voir figure 9).

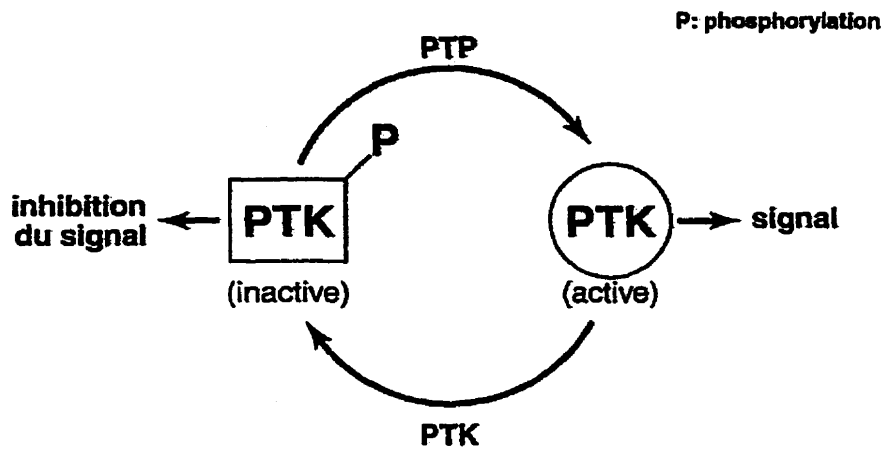


Figure 8: Événement de phosphorylation et de déphosphorylation

La PTK va déphosphoryler une protéine sur ses résidus tyrosine et cette dernière deviendra active afin d'émettre le signal spécifique tandis que la phosphorylation de cette même protéine sous l'action de la PTK va mener à l'inhibition de ce signal (inactivation de la protéine).

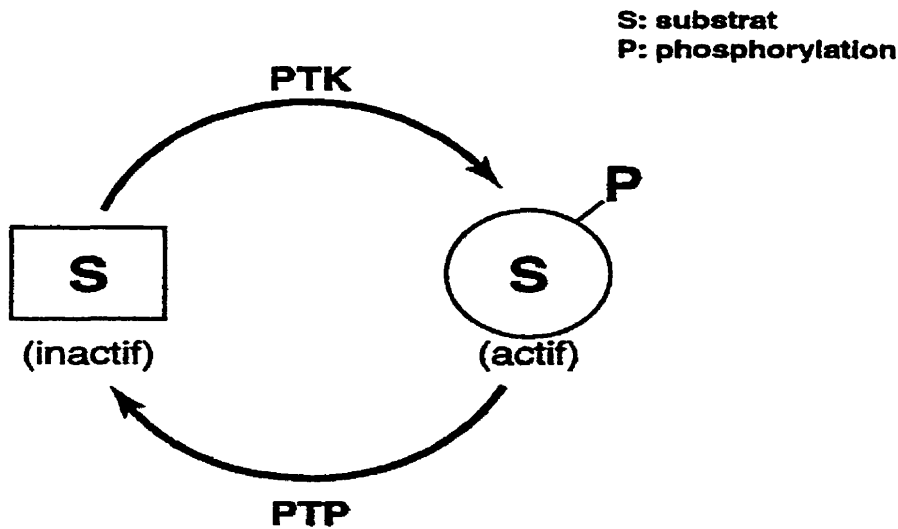


Figure 9: Régulation de la signalisation

Un substrat peut être phosphorylé par une PTK ce qui le rend actif alors que son inactivation survient par la déphosphorylation catalysée par une PTP.

Au cours des deux dernières décennies, les recherches se sont concentrées principalement sur le clonage et le séquençage des PTKs. En 1990, la première PTP (PTP1B) fut clonée (150) et la majorité des PTPs connues furent découvertes lors des sept dernières années. De nos jours, on a décrit environ 75 PTPs et on estime à plus de 500 le nombre total de gènes de PTPs dans le génome humain (151). En conséquence, leur étude représente un domaine important en pleine expansion.

Il existe deux types de PTPs: les PTPs cytosoliques (poids moléculaire de < 80, 000 Da) et celles qui sont associées à la membrane (poids moléculaire de > 80, 000 Da) (152). En général, les PTPs jouent un rôle majeur dans le maintien de la physiologie normale de la cellule en régulant l'état de phosphorylation d'un substrat soumis à l'action de PTKs. Les PTPs régulent les PTKs, de façon positive ou négative (figures 8-9), en déphosphorylant des sites spécifiques retrouvés chez ces PTKs (153). Notamment, des études ont rapporté d'innombrables informations concernant majoritairement trois PTPs: la PTP transmembranaire CD45 et les deux PTPs cytosoliques contenant deux domaines SH2 (Src-homology type-2), la SHP-1 et la SHP-2. Les molécules CD45 et SHP-2 jouent un rôle critique dans la régulation de la signalisation cellulaire suivant leur activation (154-157). Par ailleurs, la SHP-1 (aussi appelée PTP1C, SHP, HCP ou SH-PTP1) agit surtout comme un régulateur négatif de la transduction de signaux (158). Cette PTP est retrouvée principalement chez les cellules hématopoïétiques. Elle fait partie d'une sous-famille caractérisée par la présence de deux domaines SH2 et d'un seul domaine PTPase. La SHP-1 est normalement inactive à cause de l'influence auto-inhibitrice de ces deux domaines SH2. Cependant, lorsque des résidus phosphotyrosines viennent occuper ses deux domaines grâce à des motifs spécifiques (ITIM: Val/Ile-Xaa-PTyr-Xaa-Xaa-Leu/Val, où Xaa représente n'importe quel acide aminé) (160, 161), on note une augmentation de l'activité catalytique de la SHP-1. Cette liaison des domaines SH2 induirait un changement conformationnel de l'enzyme laissant l'accès libre au domaine PTPase pour les substrats potentiels (159).

Les études concernant la détermination de la fonction de la SHP-1 ont été grandement stimulées par la découverte des souris *motheaten* (*me/me*) et des souris *motheaten* viables (*mev/mev*) qui possèdent des mutations spécifiques dans le gène de la

SHP-1 (162, 163). L'allèle *me* subit une délétion d'une seule paire de bases dans son gène SHP-1 ce qui résulte en une rupture anormale et la formation d'un codon terminal prématuré. En conséquence, les souris *me/me* n'ont aucune protéine SHP-1. De plus, la rupture aberrante causée chez les souris *mev/mev* amène la production d'une protéine SHP-1 ayant des domaines catalytiques coupés (soit une délétion de 5 acides aminés ou une insertion de 23 acides aminés). Cette atteinte génère une protéine SHP-1 avec une activité catalytique fonctionnelle à 10% (162, 163). Ces deux types de souris (*me/me* et *mev/mev*) montrent des anomalies multiples dans le développement et les fonctions des cellules hématopoïétiques (164). En effet, on note une importante augmentation du nombre de cellules précurseurs érythropoïétiques, de granulocytes, de macrophages et de cellules B CD5+ menant à l'infiltration massive de ces cellules dans les poumons (pneumonie hémorragique). De plus, il y a une atteinte des fonctions des cellules T et NK alors que l'activation des cellules B CD5+ conduit à une surproduction d'auto-anticorps contre les thymocytes et les cellules épidermales (162, 165). Suite à toutes ces déficiences, les souris *me/me* et *mev/mev* développent de façon précoce une sévère maladie auto-immune et d'immunodéficience les menant à la mort dès la troisième et la neuvième semaines de vie, respectivement (162, 166). Toutes les études menées jusqu'à présent ont permis de reconnaître la SHP-1 comme un important régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation chez les cellules hématopoïétiques. Yi et collègues (167) furent les premiers à rapporter un rôle de régulateur négatif pour la SHP-1 car l'hyperprolifération des cellules Moe7 stimulées par l'IL-3 résulterait de la faible expression de la SHP-1. Donc, la SHP-1 supprime les propriétés promouvant la croissance cellulaire induite par l'IL-3 lors de son interaction avec son récepteur. Cette déphosphorylation du récepteur ou des PTKs associées au récepteur par la SHP-1 inhiberait aussi la croissance cellulaire médiée par les récepteurs de l'érythropoïétine (168) et de CSF-1 (colony-stimulating factor-1) (169). De plus, on a associé l'effet de régulateur négatif de la SHP-1 à la régulation de plusieurs voies de signalisation médiées par l'engagement du complexe antigène-récepteur (du BCR chez les cellules B (170), du TCR chez les cellules T (171) et du récepteur de c-kit (172)) ainsi qu'aux molécules cytosoliques signalisatrices (Vav et Grb2/Sos1, toutes les deux impliquées dans

l'activation de Ras) et les co-modulateurs du complexe antigène-récepteur (CD22, FcγRIIβ et CD5) (158, 173, 174). Récemment, Roach et collègues (175) ont démontré un rôle pour la SHP-1 dans le processus inflammatoire. Leur étude montre clairement que les macrophages, déficients en protéine SHP-1 (dérivés de souris *me/me*) ou ayant une protéine SHP-1 non-fonctionnelle (dérivés de souris *mev/mev*), possèdent une meilleure capacité d'adhésion et d'étalement médiées par l'intégrine $\alpha_m\beta_2$ en comparaison à des macrophages normaux. Ce processus semble requérir l'activité de la PI3-kinase (phosphatidylinositol (PI)-3-kinase) pour réguler les réarrangements du cytosquelette résultant des processus d'étalement et d'adhésion cellulaire.

1.1.7.4.1.2 Phosphotyrosines phosphatases et *Leishmania*

Des études menées *in vitro* et *in vivo* (176, 177) ont démontré que certains composés, tels le vanadium et plus récemment les composés peroxovanadium, inhibent le phénomène de la déphosphorylation chez des récepteurs de l'insuline (IRK). De plus, ces composés peroxovanadium pourraient moduler la réponse des cellules immunes en augmentant leurs activités (178).

L'élément vanadium fut découvert en 1830 par le chimiste Nils Sefstrom. Trouvé en petite concentration chez les mammifères, son implication dans la biologie cellulaire fut cernée lorsque des études ont démontré sa capacité à inhiber une variété d'enzymes, plus précisément les PTPs (revu en 179). Depuis, une série de composés dérivés du vanadium (Na orthovanadate, vanadylsulfate, bis(maltolato)oxovanadium (IV) et plus récemment, peroxovanadium) fût synthétisée afin d'étudier le rôle des PTPs dans divers processus cellulaires. Il a été démontré que ce produit pouvait avoir des effets biologiques mimant l'insuline pour la capture et le métabolisme du glucose *in vitro* (180) ce qui pourrait améliorer la thérapie pour le diabète mellitus. Effectivement, le vanadate tout comme l'insuline lorsqu'il est administré oralement, réduit significativement l'hyperglycémie chez des rats diabétiques (181, 182). Les composés peroxovanadium sont les plus puissants inhibiteurs de PTPs et ils proviennent de la combinaison du vanadate et d' H_2O_2 (où l'ion peroxyde pénètre la sphère du vanadate). Leur structure (voir figure 10) ressemble à celle du phosphate cependant l'ajout d'un groupe peroxy

augmente significativement leur efficacité comme inhibiteurs de PTPs par la hausse de leur capacité à oxyder irréversiblement les thiols liés (183). Chaque composé contient un atome central de vanadium, un groupe oxo (O^2^-), un ou deux ligands peroxy ($O^2^-_2$) et un ligand auxiliaire qui peut être variable selon le composé utilisé (soit le 1,10-phenanthroline (phen), le bipyridine (bipy), le dianion de l'acide oxadique (ox) et l'acide picolinique (pic)) (176).

Récemment, Olivier et collègues (184) ont rapporté que l'injection du peroxovanadium bpV(phen) permettait de contrôler l'infection à *L. donovani* et *L. major*. De plus, leurs études *in vitro* montrent que l'ajout de ces composés à des macrophages murins infectés résulte en l'inhibition de la croissance du parasite de façon dépendante de la dose et du temps. Ils suggèrent aussi que cette inhibition des PTPs par le bpV(phen) pourrait moduler plusieurs événements de la cellule hôte dont une hausse de la production de NO au niveau basal et suivant une stimulation à l'IFN- γ .

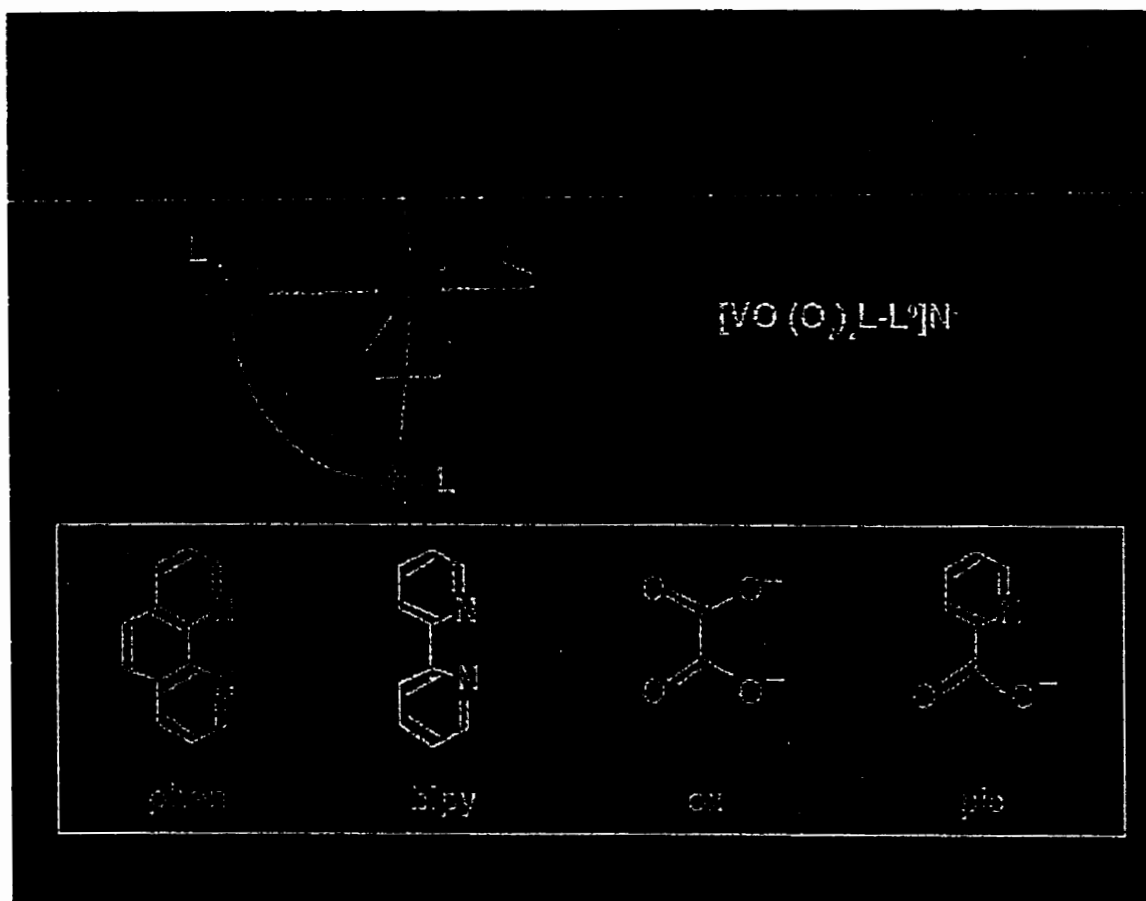


Figure 10: Les composés peroxovanadium
(tiré de Posner B. et collègues, 1994)

* L = ligand auxilliaire où phen, bipy, ox et pic représentent des ligands auxilliaires possibles

1.1.7.4.2 La signalisation dépendante du calcium

Le calcium total qui est contenu dans l'organisme, se retrouve à 99% dans les os. Ce réservoir maintient l'apport requis de calcium aux tissus via la circulation sanguine dont environ 50% du calcium plasmiq ue est lié aux protéines plasmiq ues. La distribution du calcium dans la cellule se répartie en trois groupes principaux : 1) la fraction interstitielle; 2) la fraction membranaire (la membrane plasmiq ue (MP) et le réticulum endoplasmique (RE)); 3) les autres organelles cellulaires (les mitochondries, les granules sécrétoires et les lysosomes) (185). Ainsi, le calcium est retiré du pool extracellulaire afin de se déplacer dans la cellule (186). En conséquence, l'écart étroit où se maintient la concentration du calcium extracellulaire assure une source constante de calcium pour la cellule. On retrouve une très grande concentration de calcium libre dans le pool extracellulaire (mM) alors qu'au contraire la concentration du milieu intracellulaire se retrouve sous les μM (186). En effet, chez la cellule au repos, la concentration de calcium intracellulaire est de 20 à 200nM (187). Les cellules eucaryotes possèdent des systèmes transportant le calcium dans la cellule. La MP renferme trois systèmes (une pompe ATPase spécifique, un canal calcique et un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) alors que le réticulum sarco(end)plasmique contient une pompe ATPase spécifique qui est différente de l'ATPase retrouvée dans la MP, pour la capture du calcium et un système inconnu pour la libération du calcium dans le cytoplasme. Ainsi, les cellules sont dépendantes essentiellement des pompes ATPases pour la régulation précise de leur calcium (186). Lorsque des substances interagissent avec leurs récepteurs à la surface cellulaire, les signaux exogènes sont convertis en signaux intracellulaires représentés par l'altération de la concentration de divers messagers intracellulaires afin de déclencher un événement cellulaire spécifique. Notamment, le calcium cytosolique forme un important messager intracellulaire régulant divers processus incluant l'exocytose, la contraction, le contrôle enzymatique, la régulation de gène, la prolifération cellulaire et l'apoptose (188, 189). Les cellules eucaryotes non-excitables augmentent la concentration de calcium cytosolique libre selon deux voies: 1) la libération du calcium entreposé dans les magasins intracellulaires; 2) l'influx de calcium dans la cellule provenant de l'extérieur de la cellule (190).

L'activation des transporteurs de calcium intracellulaire en réponse à un stimulus externe requiert la transmission d'un signal de la surface cellulaire à l'intérieur de la cellule. En 1986, Putney (191) a proposé un modèle pour expliquer l'influx de calcium causé par le récepteur, l'influx capacitif. Toutefois, en 1990, il apportait quelques modifications à son modèle qui prévaut toujours de nos jours (voir figure 11) (192).

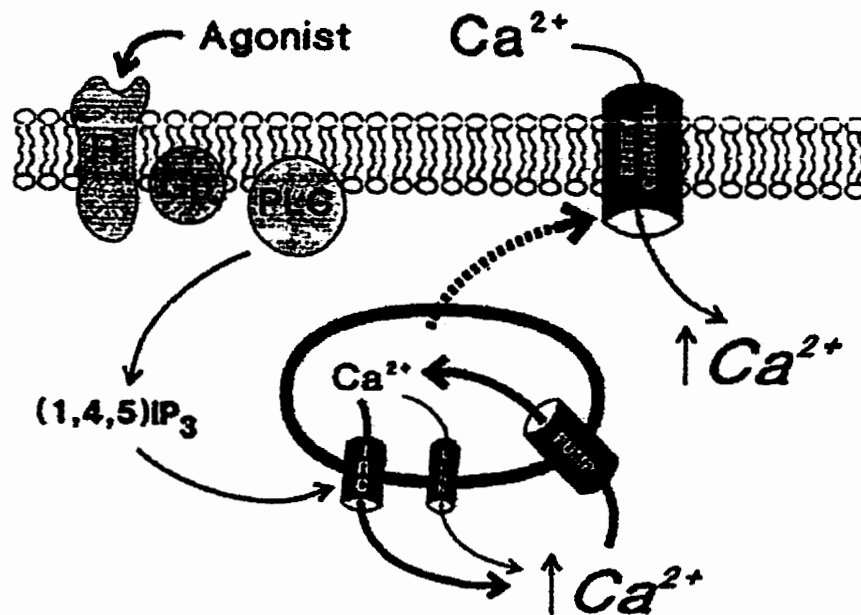


Figure 11: Modèle capacitatif
(tiré de Putney, J.W. Jr., 1990)

* La formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) suivant la liaison d'un agoniste à son récepteur amène la libération du Ca₂₊ des magasins intracellulaires de calcium. Il en résulte l'envoi d'un message (flèche pointillée) au canal calcique à la surface membranaire pour l'induction d'un flux de calcium à l'intérieur de la cellule.

Ainsi, la liaison de l'agoniste à son récepteur ROCs (receptor-operated calcium channels) provoque l'activation de la phospholipase C liée à la membrane (PLC) qui sous l'action d'une protéine G, catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). Par la suite, l'IP₃ libère le calcium des magasins intracellulaires de calcium (principalement le RE) (193). Ce métabolisme des constituents phosphoinositides est maintenant associé à la signalisation transmembranaire (194). Néanmoins, suite à ce vidage des magasins intracellulaires, l'activation du canal calcique dans la MP serait responsable d'un léger courant calcique (I_{CRAC}, calcium release-activated calcium current) à l'intérieur de la cellule, comme reporté par Hoth et Penner (195). Ainsi, ce processus implique un lien, soit le facteur de l'influx de calcium (CIF) entre le magasin intracellulaire et le canal calcique situé dans la membrane cellulaire (196). Donc, la stimulation du récepteur mène à une augmentation biphasique du calcium cytosolique traduit par la libération du calcium des magasins intracellulaires puis de l'influx de calcium subséquent dans la cellule. Le remplissage des magasins requiert la présence du calcium extracellulaire et s'effectue rapidement (l'opération est complétée en 4 min) alors que le vidage des magasins peut s'étaler sur plus de 20 min. Cette augmentation de la perméabilité de la MP envers le calcium consécutive au vidage des magasins intracellulaires, fut reportée par plusieurs études (197, 198) grâce à l'utilisation de divers composés. Notamment, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'ATPase calcique (SERCA, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) retrouvée chez les magasins intracellulaires tels la thapsigargine (Tg), le 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone (BHQ) et l'acide cyclopiazonique (CPA), a permis d'établir clairement le couplage entre les magasins intracellulaires de calcium avec la hausse de la perméabilité pour le calcium de la MP (197, 198).

1.1.7.4.2.2 Calcium et *Leishmania*

Des études (199, 200) ont démontré une importante altération de la signalisation dépendante du calcium chez les macrophages murins infectés par *L. donovani*. Olivier et collègues (199) ont démontré que ce parasite provoque une hausse soutenue de la concentration de calcium intracellulaire dans la cellule chez les macrophages stimulés par

le fMLP. Cette élévation du calcium intracellulaire serait consécutive à une augmentation de la perméabilité de la MP pour le calcium, résultante d'une altération de la pénétration du calcium des magasins intracellulaires. Leurs résultats montrent une diminution de la production d'IP₃ chez les macrophages infectés, ce qui pourrait être aussi impliqué dans l'induction soutenue de la concentration du calcium intracellulaire. Il a été suggéré que cette hausse soutenue du calcium intracellulaire découle de l'importante activité phosphatase induite par le parasite (200). Ces PTPs pourraient venir déphosphoryler la pompe ATPase des magasins intracellulaires ce qui en conséquence, empêcherait l'entrée du calcium dans ces magasins qui continuent leur vidage minime mais constant de leur contenu calcique. Ainsi, le parasite viendrait induire un mécanisme capacitatif pour l'entrée du calcium dans la cellule par l'envoi d'un message (CIF) aux canaux calciques situés dans la membrane plasmique menant à la hausse de la perméabilité membranaire observée (voir figure 12). Ainsi, l'altération de la voie de signalisation majeure dans la cellule (ie la signalisation dépendante du calcium dans les macrophages), causée par le parasite *L. donovani*, se caractérise par une augmentation significative du taux basal du calcium intracellulaire (199) et résulte en plusieurs anomalies dans les fonctions de défense du macrophage envers le parasite telles la phagocytose, la production d'IL-1, l'expression du gène c-fos induit par le LPS et les phorbol esters, l'expression des molécules du CMH classe II stimulée par l'IFN- γ ainsi que la libération des radicaux d'oxygène en réponse au fMLP ou aux phorbol esters (revu en 201).

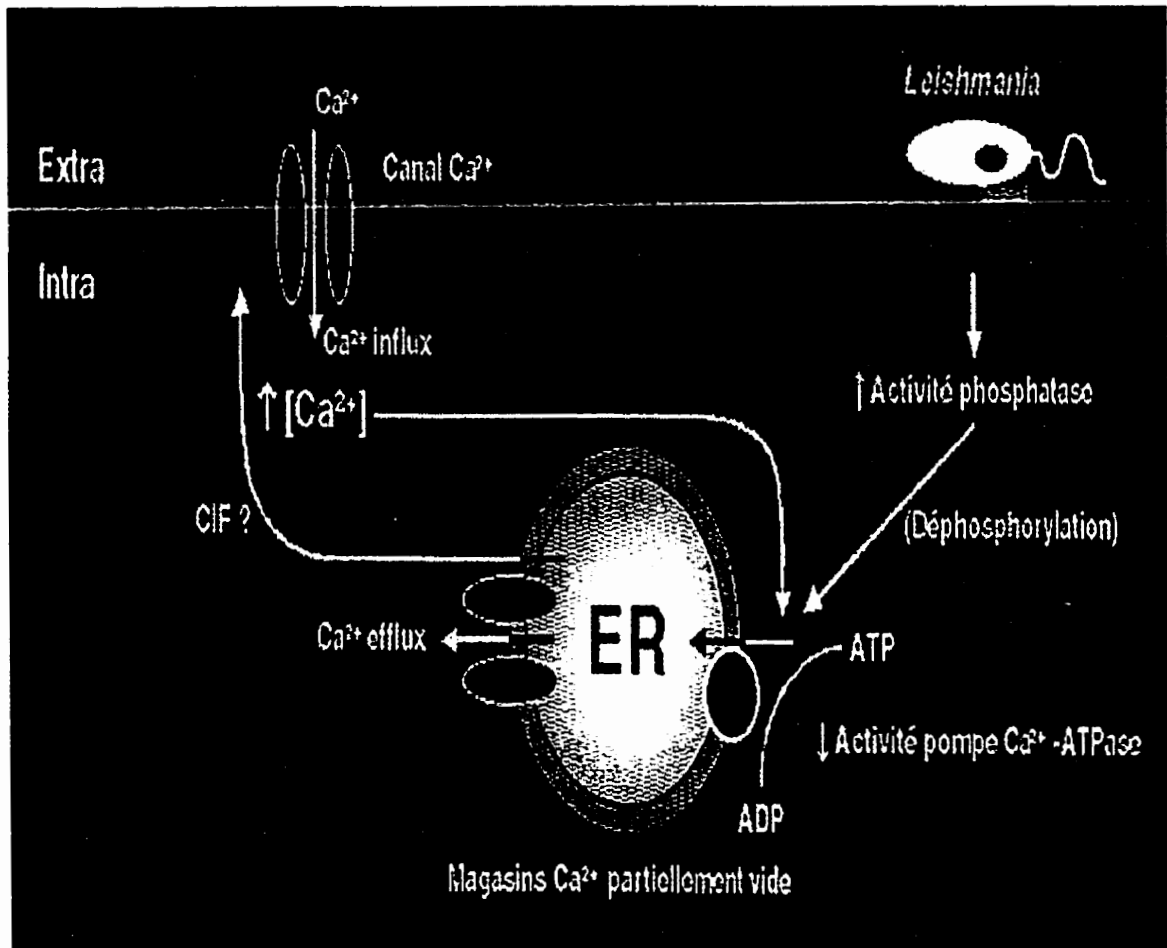


Figure 12: Modèle capacitatif induit par le parasite *Leishmania*
(tiré de Olivier, M., 1998)

* *Leishmania* induit une déphosphorylation de la pompe Ca^{2+} -ATPase résultant en une inhibition de l'entrée du Ca^{2+} dans le magasin intracellulaire (ER). Néanmoins, le magasin poursuit son vidage du Ca^{2+} dans le cytosol ce qui induit un signal CIF aux canaux calciques localisés à la membrane cellulaire. En conséquence, il y a un influx soutenu de Ca^{2+} dans le cytosol.

1.1.7.4.3 Autres actions du *Leishmania*

Cette réponse altérée du macrophage consécutive à une infection à *L. donovani* serait aussi provoquée, en partie, par l'inhibition de l'activité et la translocation de la PKC chez les macrophages humains infectés (106). Il semble que la molécule LPG de *L. donovani* empêcherait la phosphorylation du substrat par la PKC et ce, en agissant comme un chélateur d'ions de calcium, nécessaires pour sa pleine activité (202-204). L'expression du proto-oncogène c-fos, dépendante de la signalisation médiée par l'activation du calcium et de la PKC (205), se trouve aussi inhibée en présence de *L. donovani* chez des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c (135). Enfin, une étude (206) a montré que le *L. donovani* active la phosphatase SHP-1 dans la cellule hôte ce qui résulte en l'inactivation de la protéine kinase JAK-2. Ainsi, la signalisation cellulaire dépendante de l'IFN- γ se trouve être altérée.

Dernièrement, il a été démontré que la molécule LPG du parasite *L. donovani* menait à l'inhibition du processus d'inflammation en contrecarrant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (207). De fait, le LPG réduirait la migration trans-endothéliale des monocytes en supprimant l'expression de certains gènes de molécules d'adhésion (E-sélectine, « intercellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1), « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1)) et de la chimiokine MCP-1 par les cellules endothéliales (208). Ainsi, le *L. donovani*, par sa molécule LPG, pourrait empêcher les cellules de migrer au site d'infection en modulant l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines afin de contrecarrer sa destruction par les cellules compétentes et favoriser la progression de l'infection.

En résumé, l'infection à *Leishmania* conduit à une altération importante de plusieurs fonctions du macrophage, très rapidement suite à sa pénétration dans sa cellule hôte, en inhibant par le fait même différents mécanismes de défense nécessaires pour le développement d'une réponse immune protectrice. Notamment, il inhibe la signalisation cellulaire en altérant les voies dépendantes du calcium et de la PKC ainsi qu'en induisant une déphosphorylation générale des protéines cellulaires par l'induction de PTPs spécifiques ce qui conduit à l'inactivation de la cellule hôte permettant la progression de

l'infection à *Leishmania*. Donc, le parasite tire plein bénéfice de cette anergie cellulaire en soutirant divers nutriments et l'espace essentiels pour sa multiplication afin de propager son infection.

1.2 GENERALITES SUR LES CHIMIOKINES

1.2.1 Nomenclature et caractéristiques des chimiokines

L'accumulation de leucocytes au site d'infection/invasion est une caractéristique majeure du phénomène d'inflammation. Au début du siècle, Metchnikoff a émis un nouveau concept selon lequel les cellules compétentes possédaient des systèmes de défense dirigés contre les agents pathogènes (209). Sa description du processus inflammatoire tel un mécanisme de protection où les phagocytes dérivés du sang jouent un rôle majeur, demeure toujours valide de nos jours (210). Les études portant sur les mécanismes de recrutement cellulaire ont démontré l'existence d'agents chimioattractants incluant les peptides fMLP (211), le fragment C5a du complément (212), le leukotriène B₄ (LTB₄) (213) et le PAF (« platelet-activating factor ») (214). Ces agents chimioattractants proviennent de médiateurs de l'inflammation, du système du complément ainsi que des phagocytes recrutés dans les tissus affectés, à l'exception des peptides fMLP originant des bactéries. On leur a associé une activité chimiotactique envers les neutrophiles et les monocytes/macrophages (215).

Au cours des dernières années, l'existence d'un autre type d'agents chimioattractants a été démontrée. Ces peptides solubles furent regroupés dans une nouvelle famille de gènes nommée chimiokine. Le terme provient de la combinaison de « chimioattractant » et « cytokine » (216). Les chimiokines sont sécrétées par les cellules compétentes observées aux environs du site d'inflammation conduisant au recrutement cellulaire en trois étapes. Premièrement, elles favorisent l'adhésion ferme des leucocytes circulants aux cellules endothéliales vasculaires en activant des molécules d'adhésion, les intégrines. Puis, elles forment un gradient de concentration pour guider les leucocytes à travers les jonctions endothéliales et les tissus sous-jacents vers le site inflammatoire. En conséquence, les leucocytes suivront le gradient allant de la plus faible concentration vers la plus haute concentration située au lieu d'inflammation. Finalement, elles ont la capacité d'activer les fonctions effectrices des cellules compétentes pour le développement de la réponse immune (par exemple: la hausse de la libération des

radicaux d'oxygène, de l'exocytose et de la production d'enzymes de dégradation) (voir figure 13) (216).

Les chimiokines sont reconnues pour agir sur certaines sous-populations spécifiques de leucocytes. Originellement, elles ont été caractérisées par une structure primaire similaire et la conservation de 4 résidus cystéines (cys) (revu en 217). Toutefois, récemment l'identification d'un nouveau sous-groupe de la famille montre que la conservation des 4 résidus cys n'est pas commune à toutes les chimiokines (218).

Les chimiokines sont des protéines de petits poids moléculaire allant de 8 à 14 kDa. La majorité des membres de cette famille n'est pas exprimée chez des cellules non-stimulées tandis qu'on a démontré une forte induction suivant un stimulus chez une grande diversité cellulaire au niveau de la transcription et la post-transcription de leur ARNm (219). Une variété de stimuli a été reconnue pour augmenter leur expression, comme par exemple les médiateurs de l'inflammation (ie l'IL-1 α/β , le TNF- α et le LPS) (220) ainsi que les événements responsables de l'activation cellulaire du système immunitaire (ie le stimulus pour les cellules T du récepteur de ces mêmes cellules (TCR) (221) ou le complexe IgE-antigène pour les mastocytes et les basophiles) (222). La source cellulaire des chimiokines représente un large éventail incluant les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales ainsi que les cellules hématopoïétiques (219, 223). Les gènes de chimiokines sont classés dans la famille de gènes SIG (Small/Inducible Genes), classifiés selon les caractéristiques de la régulation moléculaire sans tenir compte de leur fonction potentielle et de leurs structures (224) car leur induction est généralement très rapide moins de 2 hr post-stimulation. Plus de 1% du contenu en ARNm total des leucocytes code pour des ARNm de chimiokine suivant leur activation cellulaire (225).

La première chimiokine, PF4, fut décrite en 1955 (226). Néanmoins, ce n'est qu'en 1977 que sa séquence en acides aminés fut rapportée (227). Depuis plus de 10 ans, les études ont démontré l'existence d'une multitude de chimiokines (228). La description fonctionnelle de leurs activités biologiques par un laboratoire puis le clonage de leur gène par un autre résulte en conséquence en l'assignation de plusieurs noms pour une même chimiokine (voir exemples dans le tableau 3). On les regroupe en 4 classes principales

selon la position de leurs 2 cys, situées près du N-terminal, qui peuvent être séparées par un acide aminé pour former la classe CXC ou être adjacentes ce qui caractérise la classe CC. Kelner et collègues (218) ont rapporté l'existence d'une troisième classe, la classe C, où on note la disparition de la première et la troisième cys résultant en une seule cys dans la portion N-terminale. Récemment, on a démontré une autre exception, soit la chimiokine CX3C (229) qui est une protéine membranaire intégrale avec un domaine chimiokine dans sa portion N-terminale. Elle diffère des autres chimiokines par la présence de 3 acides aminés intercalés entre les deux premiers résidus cys et par son domaine mucine. Les études portant sur la structure en trois dimensions des chimiokines ont permis d'établir que cette structure permet l'insertion de 0, 1 ou 3 acides aminés entre les deux premières cys ce qui fournit l'explication pour l'absence d'une chimiokine CX2C (voir figure 14) (228).

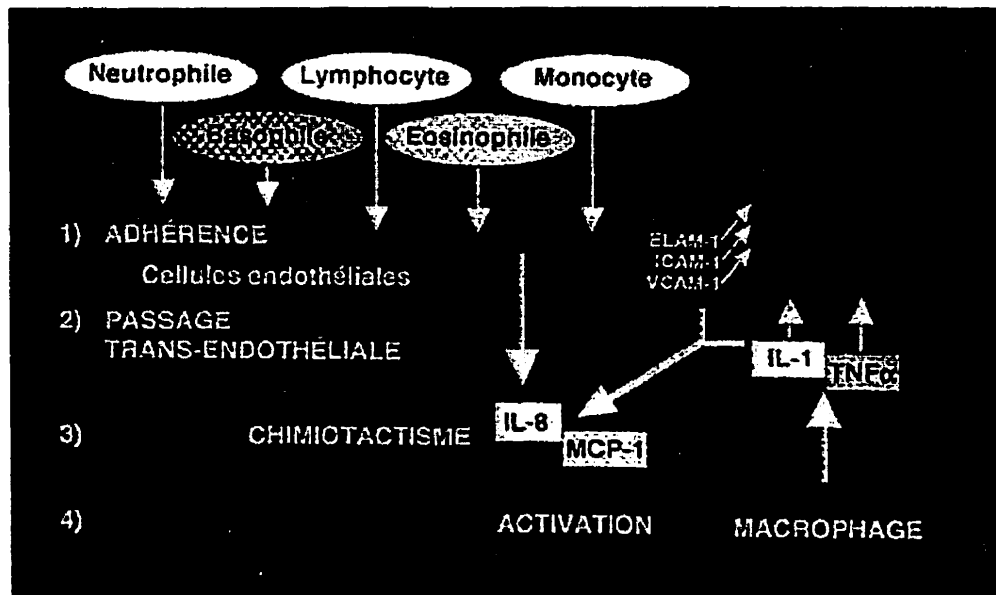


Figure 13: Rôle des chimiokines dans le processus d'inflammation

* 1) Les leucocytes vont adhérer aux cellules endothéliales suivant l'action des molécules d'adhésion et de certaines chimiokines; 2) Les leucocytes vont migrer via un passage transendothélial vers le site d'infection sous l'action du gradient de concentration formé par les chimiokines; 3) chimiotactisme; 4) Les chimiokines assurent l'activation des cellules compétentes, déclenchant leurs mécanismes de défense et la libération de certaines molécules pro-inflammatoires (IL-1, TNF) participant au processus inflammatoire.

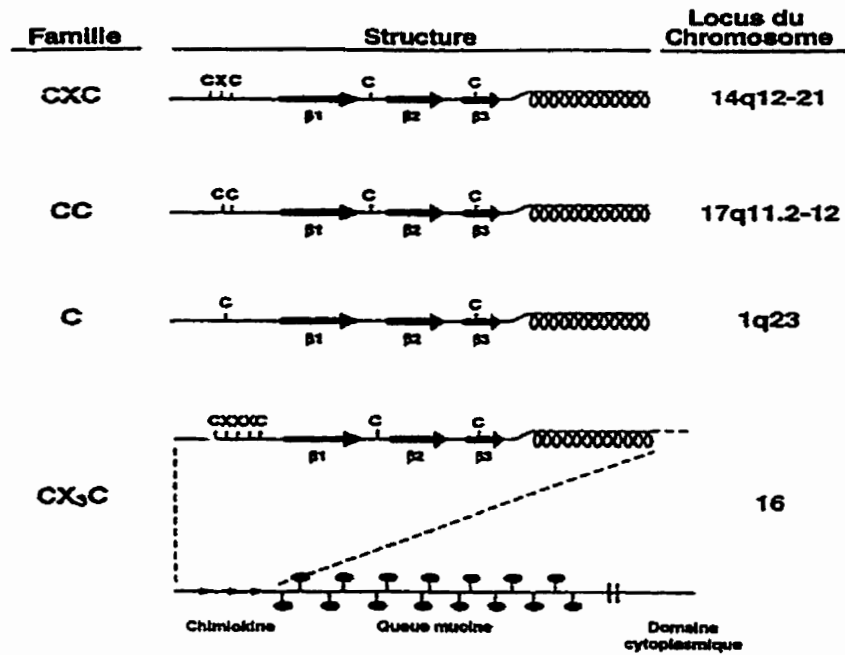


Figure 14: La structure des 4 groupes de chimiokines
(tiré de Rollins, B.J., 1997)

Il y a 4 grandes familles de chimiokines classées selon la position de leurs résidus cystéines, soit: 1) la classe CXC; 2) la classe CC; 3) la classe C; 4) la classe CX₃C qui a une queue mucine de plus en comparaison des autres groupes.

1.2.1.1 La classe CXC:

La sous-famille α représente la deuxième appellation de la classe CXC. Les gènes de cette classe sont regroupés dans le génome sur le chromosome 4q12-21 humain et le chromosome 5 chez la souris. Ils consistent en 4 exons et 3 introns où les gènes de PF4 et PBP font exception avec 3 exons et 2 introns (230). Les gènes de cette classe originent d'un gène ancestral commun (231). En général, les membres de cette classe sont associés à la régulation des activités des neutrophiles et ils demeurent impuissants envers les monocytes/macrophages ainsi que les lymphocytes (219). L'identification d'un déterminant majeur pour l'activité et la puissance envers les neutrophiles fut rapportée dans le domaine N-terminal de certaines chimiokines. Il se compose d'un motif de trois acides aminés (glutamate-leucine-arginine) entre le N-terminal et la première cys (232, 233). Les chimiokines qui contiennent ce motif ERL renferment l'IL-8, les Gro- $\alpha/\beta/\gamma$, l'ENA-78, la GCP-2 et les PBP/CTAPIII/ β -TG/NAP-2 et sont chimiotactiques envers les neutrophiles (219). Au contraire, la PF4, l'IP-10, la mig, les SDF-1 α/β ne possèdent pas de motif ERL et en conséquence, n'ont aucune action sur les neutrophiles (228). Elles vont induire l'infiltration de cellules mononucléaires (234).

Tableau 3: Principaux membres de la famille CXC

Humain	Autres Noms	Murin	Autres Noms	Autres Espèces	Fonctions
ERL:					
IL-8	NAP-1, NAF, MONAP, MDNCF, 310-C, NCF, LYMAP, TCF, LAI, TSG-1	-	-	IL-8/pAMCF1 (porc) rab NAP-1 (lapin)	active N, chimio N/T angiogénique
Gro- α	MGSA, NAP3	Gro-1	KC	CINC (rat), haGRO (hamster), rab-RPF2/Gro (lapin)	chimio N mitogène
Gro- β	MIP-2 α	Scyb2	-	-	idem Gro- α
Gro- γ	MIP-2 β	-	-	-	idem Gro- α
GCP-2	CXCL6, CKA-3	-	-	GCP2 (bovin)	chimio N
NAP-2(β TG/ PBP/CTAPIII)	-	-	-	NAP2/CTAPIII (porc), 9E3/CEF (poulet)	chimio F/N active tissu conj.
ENA-78	CXCL5, LIX	Scyb5	-	-	chimio N
Non-ERL:					
IP-10	γ -IP	Crg-2	C7	-	chimio M/T
HuMIG	-	Mig	-	-	chimio M/TILS
PF4	CXCL4	-	-	PF4 (rat, bovin), pAMCFII (porc)	chimio M/ L anti- angiogénique
SDF-1 α/β	PBSF, CXCL12	Sdf1	-	-	chimio T/B
ITAC	CXCL11, IP-9	-	-	-	chimio T
BLC/BCA-1	CXCL13, BLR1L	-	-	-	chimio B

* N= neutrophile, M= monocyte/macrophage, T= lymphocyte T, F= fibroblaste, L= leucocyte, B= lymphocyte B; chimio= chimioattractant pour...

1.2.1.2 La classe CC:

La branche CC (aussi nommée famille β) regroupe des gènes localisés sur le chromosome humain 17q11.2-12 et le chromosome 11 chez la souris. Les membres de ce sous-groupe se composent généralement de 3 exons et 2 introns cependant C10/SCYA6 constitue l'exception avec ses 4 exons et 3 introns (235). De plus, I-309/TCA-3 contient une paire de cys de plus que les autres chimiokines ce qui lui confère 6 résidus cys (236). Ce groupe de chimiokines est reconnu pour induire le recrutement d'une grande variété cellulaire incluant les monocytes/macrophages, les lymphocytes, les basophiles et les éosinophiles (219) (voir tableau 4).

Tableau 4: Principaux membres de la famille CC

Humain	Autres Noms	Murin	Autres Noms	Autres Espèces	Fonctions
I-309	hsise	TCA-3	P500, sise	-	chimio M/E
MCP-1	MCAF/MCF, hJE, LDCF,GDCF,HC11 TSG-8,SCYA2,A2	JE	-	JE (rat), MCP-1 (lapin)	chimio M/L/B active B libère histamine
MCP-2	HC14	-	-	-	chimio M/L/B/E
MCP-3	NC28,SCYA7	MARC	FIC	-	chimio M/L/B/E active B/E
MCP-4	CCL13	MCP-4	-	-	chimio M/T/E
MCP-5	CCL12	Scya12	-	-	chimio M/T/E
MIP-1 α	pLD78,hsis α / β pAT464,GO519	Scya3	Ty5,sis α / β ,SC L2G25B,MIP-1	-	chimio M/L/B/E/D pyrogène
MIP-1 β	hH400,hsisy,Act-2	MIP-1 β	H400,sisy,MIP-1	-	chimio M/L/D pyrogène
MIP-3 α	LARC,exodus	-	-	-	chimio T/D
MIP-3 β	ELC,exodis-3	-	-	-	chimio T
MIP-4	PARC,DC-CK-1, CK β -7	-	-	-	chimio T/E
MIP-5	HCC-2, MIP-1 δ	MIP-5	-	-	chimio M/T/E/D
RANTES	hsis δ , CCL5	SCYA5	-	-	chimio M/B/E/D/T mémoire libère histamine
Eotaxine-1	CCL11	Scya11	-	Eotaxine (cochon Inde)	active/chimio E
SLC	exodus-2, 6CKine	Scya21	-	-	chimio T/D
MDC	STCP-1, ADAM	Scya22	-	-	chimio NK/M/T/E/D
HCC-1	CCKK-1, CCKK-3	-	-	-	chimio M/D
TARC	CCL17, ABCD-2	Scya171	-	-	chimio M
-	-	C10	SCYA6	-	inconnue

* M= monocyte/macrophage, L= lymphocyte, B= basophile, E= éosinophile, D= cellule dendritique; NK= cellules NK; chimio= chimiioattractant pour...

1.2.1.3 La classe C:

La sous-famille γ renferme un seul membre, la lymphotactine. Le gène de cette chimiokine se retrouve dans la région distale du chromosome 1 humain/souris et est en relation avec quatre gènes soit les gènes codant pour le ligand de Fas (FasL), l'antithrombine 3 (AT3), la sélectine de l'endothélium (E-sélectine ou ELAM) et le facteur de transcription liant un octamine (Otf1) (218, 237). Toutefois, l'organisation génomique de la lymphotactine demeure encore sous étude. Son expression a été démontrée spécifiquement chez les cellules T CD8⁺ activées. La lymphotactine exerce son activité chimiotactique envers les cellules T CD8⁺ et à moindre niveau, les cellules T CD4⁺ et les cellules NK. Les neutrophiles et les monocytes ne sont nullement affectés par cette chimiokine (218, 237).

1.2.1.4 La classe CX3C:

Récemment, on a démontré l'existence d'une 4^{ème} classe de chimiokines (sous-famille δ), incluant la fractalkine/neurotactine (229, 238). On a localisé le gène sur le bras long du chromosome 16q humain et du chromosome 8 de la souris (238). Cette chimiokine transmembranaire de type 1 contient un prolongement de 19 résidus hydrophobes à son extrémité carboxyl. En outre, elle possède 3 cys additionnelles à la portion C-terminale consistant en 1 cys transmembranaire et 2 cys situées dans le domaine cytoplasmique (238). La fractalkine se retrouve principalement chez les cellules endothéliales et les fibroblastes mais est absente chez les leucocytes ce qui lui confère un rôle important dans le recrutement des leucocytes du sang. En effet, la fractalkine existe comme une glycoprotéine liée à la membrane possédant le domaine chimiokine au sommet d'un domaine mucine. Cette forme permet l'adhésion ferme des monocytes et des cellules T à la surface des cellules endothéliales où elle est exprimée. La forme soluble, produite par une protéolyse, est un puissant agent chimioattractant pour les monocytes et les cellules T (229, 239). Ainsi, la fractalkine est une molécule versatile.

1.2.2 Les récepteurs de chimiokines

Les expériences de désensibilisation croisée consistent en une première stimulation du récepteur par l'ajout d'une première chimiokine puis l'addition d'une deuxième chimiokine qui désensibilise ou non ce même récepteur ce qui indique si les deux chimiokines lient ce même récepteur. Cette technique a permis d'établir que les récepteurs de chimiokines lient plusieurs chimiokines différentes et en plus, les chimiokines ont l'habileté de se lier à plusieurs récepteurs différents ce qui rend leur étude très difficile (voir tableau 5).

On pourrait peut-être expliquer le chevauchement partiel des fonctions *in vitro* de certaines chimiokines par la proximité de liaison de leurs récepteurs. Cependant, la plupart des récepteurs sont du moins spécifiques pour un sous-groupe de chimiokines particulier, avec quelques exceptions (ie antigène Duffy qui lie plusieurs chimiokines appartenant à chaque classe) (240, 241). Il existe plusieurs classes de récepteurs de chimiokines, soit les récepteurs CXC, les récepteurs CC, les récepteurs C, les récepteurs CX3C et les autres récepteurs. Ces chaînes de polypeptides de 300-400 acides aminés en longueur ont été associées à la superfamille de récepteurs couplés à une protéine G et ayant 7 domaines transmembranaires (242). En effet, les réponses cellulaires causées par les chimiokines sont en majorité inhibées en présence de la toxine de pertussis (243). Par ailleurs, ces récepteurs possèdent quelques parties structurales uniques telle la séquence d'acides aminés DRYLAIV dans le deuxième domaine de la boucle intracellulaire qui affecterait la capacité de liaison du récepteur à son ligand (244).

L'activation du récepteur mène à l'inhibition de la production d'AMPc toutefois, il y aurait d'autres voies de transduction de signaux impliquées dans un tel phénomène. Ainsi, l'activation de la PI3-kinase et la MAP kinase a été reliée à la réponse envers la MCP-1 (245, 246) et la RANTES (247). Toutefois, les mécanismes précis qui sont impliqués dans l'activation du récepteur couplé à son ligand menant aux réponses physiologiques complexes telle le chimiotactisme, demeurent toujours sous étude.

1.2.2.1 Les récepteurs de chimiokines CXC:

Il y a 5 récepteurs clonés pour les chimiokines CXC dont 2 lient l'IL-8 avec une haute affinité (le CXCR1= IL-8RA et le CXCR2= IL-8RB). Les chimiokines possédant le motif ERL se lient à l'un ou l'autre de ces récepteurs. La spécificité pour le ligand réside dans la portion N-terminale de ces deux récepteurs (248). Le récepteur CXCR1 se retrouve uniquement sur les neutrophiles tandis que le CXCR2 fut localisé sur les neutrophiles ainsi qu'à un niveau moindre, sur les monocytes, les cellules T Jurkat et certaines lignées de mélanomes (249). Il existe trois récepteurs qui lient les chimiokines CXC sans le motif ERL: le CXCR3, le CXCR4 et le CXCR5 (250, 251). Le CXCR3 qui lie l'IP-10, la MIG et la chimiokine nouvellement découverte 6ckine (252, 253), est exprimé sur les cellules T humaines et possiblement les cellules NK (254). Le récepteur CXCR4 fut cloné en premier comme LESTR/fusin, un récepteur orphelin. Cependant, il a récemment été démontré qu'il agissait comme un co-récepteur de la molécule CD4 pour des souches HIV-1 induisant la formation de syncytiums (255). Il lie SDF-1 et on le retrouve à la surface des cellules T naives et des cellules T activées (256). Les cellules B expriment le CXCR5 qui interagit avec les chimiokines BCA/BLC et ITAC (256). (voir tableau 5)

1.2.2.2 Les récepteurs de chimiokines CC:

Les récepteurs associés aux chimiokines CC apportent beaucoup plus de confusion car ils montrent un important chevauchement dans leurs spécificités. Effectivement, la plupart des ligands ont des spécificités croisées à l'exception de l'éotaxine liant seulement CCR3 ainsi que la MIP-1 β liant uniquement au CCR5. Les CCR1, CCR4 et CCR5 sont sélectifs pour la MIP-1 α et la RANTES et sont exprimés constitutivement chez les monocytes. Néanmoins, chacun est aussi spécifique à une 3^{ème} chimiokine non-partagée avec les autres, soit la MCP-3 pour le CCR1, la MCP-1 pour le CCR4 et la MIP-1 β pour le CCR5. Le CCR1 est exprimé chez les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Toutefois, on le retrouve aussi à la surface des éosinophiles ce qui pourrait expliquer l'effet de la MIP-1 α sur le recrutement des éosinophiles (257). Le CCR2 se présente sous 2 formes résultant d'un épissage alternatif (258). Les CCR2A et CCR2B diffèrent

uniquement au niveau de leur queue intracellulaire C-terminale et leurs ligands sont identiques (ie MCP-1, MCP-3 et MCP-5) (259-261). Les éosinophiles expriment fortement le CCR3 qui lie avidement les chimiokines recrutant spécifiquement les éosinophiles (ie éotaxine, RANTES, MCP-2, MCP-3 et MCP-4) (262). Chez les basophiles, on a cloné le CCR4 dont les ligands sont MIP-1 α , RANTES et MCP-1 (263). Un clonage homologue a en conséquence permis l'identification sur les monocytes et les cellules T du CCR5 qui lie avec une haute affinité les MIP-1 α/β et la RANTES (264). Depuis, on a rapporté l'existence de quelques autres récepteurs de chimiokines CC, exprimés principalement sur les monocytes/macrophages. (voir tableau 5)

1.2.2.3 Les récepteurs de chimiokines C et CX3C:

Tout récemment, Yoshida et collègues (265) ont identifié un récepteur spécifique à la lymphotactine, le XCR-1. La fractalkine médie son action sur les leucocytes en liant son récepteur, le CX3CR1 (266). (voir tableau 5)

Tableau 5: Récepteurs de chimiokines

Récepteurs	Ligands
<u>Récepteurs CXC</u>	
ERL:	
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, Gro- $\alpha/\beta/\gamma$, NAP-2, ENA-78, GCP-2
Non-ERL:	
CXCR3	IP-10, MIG, 6ckine, ITAC
CXCR4	SDF-1 α/β
CXCR5	BLC/BCA-1
<u>Récepteurs CC</u>	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3, MIP-1 δ , MIP-3, MIP-5, HCC-1
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5
CCR3	éotaxine-1/2, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5
CCR4	MIP-1 α , RANTES, MCP-1, TARC, MDC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC, 6ckine, SLC
CCR8	I-309, TARC, MIP-1 β
CCR9	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1 à 5, éotaxine
<u>Récepteur C</u>	
XCR-1	lymphotactine
<u>Récepteur CX3C</u>	
CX3CR1	fractalkine

1.2.2.4 Les récepteurs autres

D'autres récepteurs liant diverses chimiokines existent en plus de ces récepteurs. Notamment, le récepteur pour l'antigène Duffy (DARC) exprimé à la surface des érythrocytes (267) est aussi reconnu pour lier des chimiokines des classes CXC et CC avec une haute affinité (268), en plus d'être un récepteur pour le *Plasmodium vivax* lors de l'invasion par ce parasite responsable de la malaria (269). Toutefois, il n'y a aucune induction de la signalisation intracellulaire reliée à la liaison des chimiokines avec le récepteur DARC. Ce dernier servirait au nettoyage des chimiokines dans le flot sanguin. En outre, il y a quelques exemples d'ADN viraux codant pour des molécules similaires aux récepteurs de chimiokines (voir tableau 7). En effet, des gènes de virus herpès codent pour des récepteurs de chimiokines fonctionnels chez l'homme (cytomégalovirus, CMV; herpès virus humain-8, HHV-8) et chez le singe-écureuil (*Herpès virus samiri*). Ce dernier génère ORF ECRF3, une protéine très similaire aux CXCR1 et CXCR2. Elle est sélective pour l'IL-8, la Gro- α et la NAP-2 (270). De plus, le CMV produit l'ORF US28 liant les MIP-1 α/β , la RANTES et la MCP-1 avec une même affinité (271, 272). Récemment, on a aussi identifié deux autres gènes servant de récepteurs pour les chimiokines, soit l'ORF US27 et l'UL33 (273). En outre, le HHV-8 qui est hautement associé au sarcome de Kaposi et aux lymphomes associés au SIDA, code pour un gène ORF 74 ayant une homologie de séquence avec le CXCR1 (274). Le virus vaccinia (poxvirus) produit le vCKBP qui n'est pas homologue aux autres récepteurs de chimiokines. Ce récepteur lie avec haute affinité les chimiokines de la classe CC mais non celles de la classe CXC (275). Par ailleurs, le virus Epstein-Barr (EBV) induit l'expression d'un récepteur de chimiokine chez des cellules transformées de lymphome de Burkitt. La molécule EB-1 (EBV-induced molecule 1), aussi nommée CCR7, est le seul ligand connu pour l'ELC/MIP-3 β (276). Malgré tout, la fonction biologique de ces récepteurs demeure toujours inconnue. Par ailleurs, on rapporte l'existence de plusieurs récepteurs orphelins chez l'humain (ie BLR1/MDR-1S, EB11/BLR2, RM2/CMK-BRL-1, R12) mais leurs ligands ainsi que leurs fonctions sont indéterminés (277, 278). Néanmoins, il est possible que ces différents récepteurs, d'origine virale ou autre, aient la

capacité d'interagir avec les chimiokines afin de les séquestrer et par conséquent, les neutraliser pour les empêcher d'effectuer leurs actions chimiotactiques.

Tableau 6: Récepteurs autres générés par les virus
(traduit de Lalani, A.S. et al., 1997)

Récepteurs serpentinaux viraux homologues	
<u>Herpèsvirus</u>	
CMV murin	M33
CMV humain	US27, US28, UL33, UL78
herpèsvirus Saimiri	ECRF3
herpèsvirus-2 équine	E1, orf74
herpèsvirus-6 humain	UL78, U12, U51
herpèsvirus-7 humain	ORF 17, ORF 57
KSHV (HHV-8)	ORF 74
<u>Poxvirus</u>	
swinepox	K2R
capripox	Q2/3L
Ligands de chimiokines viraux homologues	
<u>Herpèsvirus</u>	
herpèsvirus-6 humain	U83, DR1, DR6
KSHV (HHV-8)	K4, K6
CMV murin	HJ1
<u>Poxvirus</u>	
<i>Molluscum contagiosum</i>	MC148R
Protéines liant les chimiokines virales sécrétées	
<u>Poxvirus</u>	
Myxoma	M-T7 (type-I)
Myxoma	M-T1 (type-2)
quelques orthopoxvirus	33 kDa (type-II)

1.2.3 Les fonctions des chimiokines

Les chimiokines accomplissent une multitude de fonctions comme la majorité des molécules de la signalisation extracellulaire. Notamment, des études menées *in vitro* ont montré que les chimiokines ont la capacité d'activer un large éventail de fonctions cellulaires telles le chimiotactisme, la réorganisation du cytosquelette et l'induction des molécules d'adhésion. Plus précisément chez les cellules myéloïdes, on note la libération des enzymes granulaires et la production d'oxydants antimicrobiens et de médiateurs de l'inflammation (279, 280). L'association de l'activation de ces diverses fonctions avec une hausse transiente du $[Ca^{2+}]_i$ a été rapportée et elle fournit la mesure de l'activation du récepteur (281). Toutefois, les chimiokines varient dans leur capacité à induire ces différentes fonctions selon le type cellulaire étudié et les stimuli utilisés (282-284). De plus, les chimiokines peuvent aussi réguler la prolifération et la différenciation cellulaire. On les a associées au développement de la myélopoïèse (par exemple: la MIP-1 α) (285), l'angiogénèse (ie les chimiokines CXC+ERL l'induisent (286) et les chimiokines CXC non-ERL l'inhibent (287)) et la régulation de la croissance des cellules tumorales (ie Gro- α et IP-10) (288).

Néanmoins, les propriétés des chimiokines observées *in vitro* prédisent-elles leurs propriétés *in vivo*? L'utilisation de souris transgéniques qui surexpriment les chimiokines, a permis de déterminer le fonctionnement des chimiokines *in vivo*. Par exemple, l'utilisation de souris surexprimant l'IL-8 (289), la MCP-1(290) ou la Gro- α (291) a permis la démonstration de leur implication dans le recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages et l'infiltration de cellules inflammatoires au thymus. Les chimiokines exercent leurs action chimioattractante uniquement lorsqu'elles sont exprimées localement et à niveaux bas car l'administration systémique des chimiokines antagonise leurs effets locaux. Il semble aussi que les chimiokines attirent les leucocytes sans nécessairement les activer. Ainsi, ces résultats suggèrent que les chimiokines ont la capacité d'attirer les leucocytes mais que d'autres signaux sont requis pour leur activation.

1.2.4 Maladies inflammatoires et chimiokines

Au cours des dernières années l'étude des chimiokines a pris de plus en plus d'importance à cause de leur rôle clé dans le processus de l'inflammation. Notamment, les leucocytes migrants en réponse aux chimiokines contribuent généralement au développement de la pathogenèse associée à la maladie inflammatoire due à une infection. Au contraire, ce même recrutement cellulaire, induit par les chimiokines, peut aussi être critique pour la défense de l'hôte menant à l'éradication des agents pathogènes. Les modèles animaux sont utiles pour l'étude du phénomène d'inflammation correspondant aux maladies humaines et permettent de démontrer que la production de chimiokines peut être bénéfique ou mauvaise pour l'hôte. Cette section regroupe, en premier lieu, l'action des chimiokines sur le développement de l'infection associée à divers agents pathogènes (bactéries, virus, parasites). En second lieu, une brève revue de l'action de chimiokines sur le développement de diverses pathologies est exposée.

1.2.4.1 Les chimiokines et les agents pathogènes:

Les défenses antimicrobiennes de l'hôte nécessitent la génération d'une importante réponse inflammatoire impliquant le recrutement de neutrophiles et de phagocytes mononucléaires afin de détruire rapidement les microorganismes. Certains pathogènes ont développé le moyen d'exploiter ou de contrecarrer l'action antimicrobienne des chimiokines. Le système d'exploitation se répartit en deux modes majeurs. Le premier réfère à l'utilisation des récepteurs de chimiokines comme porte d'entrée chez la cellule hôte par l'agent pathogène. Notamment, la liaison du récepteur Duffy par le *P. vivax* permet son entrée chez les érythrocytes (269). Le second système consiste en l'élaboration de récepteurs de chimiokines générés par les virus chez l'hôte, revu précédemment dans la section 1.2.2.4. Par ailleurs, la subversion de l'action des chimiokines renferme elle-aussi deux modes. La formation d'antagonistes de chimiokines générés par le pathogène correspond au premier mode. Ces antagonistes proviennent de modifications effectuées par le pathogène chez des séquences codantes pour les chimiokines de l'hôte qui leur fournissent une nouvelle fonction. Par exemple, le KSHV (herpès virus associé au sarcome de Kaposi) possède deux ORFs (K4 et K6) codant pour

des chimiokines de la classe CC, soit la vMIP-I et la vMIP-II. Elles sont identiques à 25% à la séquence en acides aminés des autres chimiokines CC (292, 293) et elles suppriment le chimiotactisme des monocytes ainsi que le phénomène d'angiogénèse, dans un modèle de membrane d'oeuf de poule (294). Finalement, certains poxvirus (ie le myxoma virus, le pox virus du lapin et le vaccinia virus) génèrent la sécrétion de protéines qui agissent en contrecarrant l'action d'une large étendue de chimiokines des classes CXC et CC. Il est intéressant de noter que ces protéines n'ont aucune homologie de séquence avec les chimiokines, leurs récepteurs ou tout autre protéine de l'hôte (295-297).

1.2.4.1.1 Infections bactériennes et mycoses:

En général, les infections bactériennes aiguës sont caractérisées par une prédominance de neutrophiles (par exemple: *Streptococcus pneumoniae* (298)) ce qui implique la participation des chimiokines de la famille des CXC. Par ailleurs, les atteintes bactériennes sous-aiguës et chroniques sont définies par un fort recrutement de phagocytes mononucléaires et de lymphocytes (par exemple: infection à *Borrelia burgdorferi* (299)) résultant d'une induction de l'expression des gènes de chimiokines CC et C.

Les cellules épithéliales sont les premières cellules rencontrées par plusieurs pathogènes entériques. L'étude menée par Eckman et collègues (300) montre que l'entrée de certaines bactéries dans la cellule, comme par exemple les bactéries résidant dans les vacuoles phagosomales (*Salmonella spp.*) et les bactéries entrant dans le cytoplasme (*Listeria monocytogenes*), stimule la sécrétion d'IL-8 alors que d'autres non-invasives comme *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium* en sont incapables. Ainsi, *S. typhimurium* suivant son attachement aux cellules épithéliales intestinales induit des signaux qui sont responsables du recrutement dirigé des neutrophiles à travers l'épithélium intestinal. Les signaux responsables de l'induction de la réponse inflammatoire sont associés à l'IL-8 (300, 301). Plus précisément McCormick et collègues (302) ont identifié le PEEC (*pathogen-elicited epithelial chemoattractant*), un puissant chimioattractant pour les neutrophiles lors du développement de salmonelloses. Par ailleurs, l'infection à *Listeria monocytogenes* chez des souris déficientes en CCR2 se propage, dû à une altération du recrutement de macrophages au site d'infection causée par

l'absence de CCR2 (303). En effet, l'étude effectuées par Zhou et collègues (303) a démontré que l'injection de LPS chez des souris provoquait une déficience en l'expression du CCR2 à la surface des monocytes qui suivant une injection subséquente de thioglycollate, résultait en une altération majeure de l'infiltration de macrophages nécessaires au contrôle de l'infection. Ainsi, la MCP-1 serait aussi impliquée dans l'éradication de l'infection à *L. monocytogenes* en causant une accumulation massive de macrophages.

L'inoculation intratrachéale de *Klebsiella pneumoniae* chez la souris CD-1 montre qu'il y a une détresse respiratoire coïncidant avec une importante accumulation de neutrophiles dans l'interstitium du poumon, reliée à l'expression et la production de l'ARNm et la protéine de la MIP-2. Chez les animaux traités avec des anticorps anti-MIP-2, une diminution de 36% du recrutement de neutrophiles a été rapportée et associée à une éradication altérée de *K. pneumoniae* (304). Tsai et collègues (305) ont démontré que les souris transgéniques surexprimant la KC (Gro- α), inoculées avec *K. pneumoniae*, ont une meilleure survie, résultante d'une forte éradication de la bactérie et d'un important recrutement de neutrophiles.

Par ailleurs, l'infiltration de leucocytes dans les poumons de souris injectées avec la levure *Cryptococcus neoformans* est concomittant à la production de la MCP-1 observée dans les poumons qui augmente jusqu'à la cinquième semaine, lors de la pathogenèse. L'importance de la MCP-1 dans le contrôle de l'infection à *C. neoformans* a été démontrée par l'injection d'anticorps anti-MCP-1 qui augmente la dissémination de *C. neoformans* au cerveau et le taux de mortalité des animaux (306). La MIP-1 α serait aussi un important médiateur de la protection chez les souris CBA/J envers l'infection à *C. neoformans* (307, 308).

La tuberculose pulmonaire causée par *Mycobacterium tuberculosis* est caractérisée par une inflammation granulomateuse accompagnée d'une infiltration massive de phagocytes mononucléaires. Le fluide pleural de patients atteints de tuberculose renferme une importante concentration de la MIP-1 α et la MCP-1 (309). De plus, des macrophages stimulés *in vitro* avec la protéine purifiée (PPD) ou le *M. tuberculosis* total expriment des hauts taux de la MCP-1 et, à moindre niveau de l'IL-8 (310).

Le syndrome du choc toxique qui est caractérisé par de la fièvre, de l'hypotension, une desquamation de la peau et une atteinte de plusieurs organes, résulte de l'action des exotoxines de *Staphylococcus aureus*. Des monocytes humains, traités avec les entérotoxines A et B libèrent de hauts taux d'IL-8 servant de signal inflammatoire initial pour le recrutement de neutrophiles dans les tissus atteints (311, 312).

Kernacki et collègues (313) ont rapporté que chez la souris, lors d'une infection de la cornée causée par *Pseudomonas aeruginosa*, il y a expression de plusieurs chimiokines, soit l'éotaxine, l'IP-10, la MCP-1, les MIP-1 α/β , la MIP-2 et la RANTES qui pourraient jouer un rôle majeur. Lors d'une infection à *Borrelia burgdorferi*, l'agent causal de la maladie de Lyme, on observe un fort recrutement leucocytaires dans les organes cibles tels la peau, le coeur et le système nerveux. De plus, ce pathogène induit une forte expression de la RANTES, la MCP-1, l'IL-8, la Gro- α et l'IP-10 chez les cellules endothéliales et les fibroblastes humains (314).

Les chimiokines CXC, particulièrement l'IL-8 et la Gro- α , sont associées au fort recrutement de neutrophiles et à moindre niveau, de monocytes et cellules T qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection à *Chlamydia trachomatis* et *C. psittaci* chez des cellules épithéliales cervicales (315). Au contraire, les cellules épithéliales mises en présence de *Neisseria gonorrhoeae* expriment et sécrètent l'IL-8 ainsi que la MCP-1 (316).

Les tissus périodentaires superficiels sont occasionnellement exposés à une flore de bactéries anaérobiques gram négative provoquant une inflammation et une destruction du tissu gingival infecté. L'étude menée par Tonetti et collègues (317) a associé l'expression d'IL-8 à l'épithélium fonctionnel, la surface la plus exposée aux divers microorganismes alors que la MCP-1 est détectée dans le tissu conjonctif infiltré et l'épithélium oral. Cette distribution particulière est corrélée avec la localisation des leucocytes polymorphonucléaires et des macrophages. En plus, l'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* qui est l'agent pathogène clé de ce type d'infection, augmente l'expression d'IL-8 chez les cellules épithéliales gingivales afin de favoriser le recrutement de neutrophiles et d'induire les défenses de l'hôte (318, 319).

L'*Helicobacter pylori* induit une gastrite qui se compose d'une infiltration leucocytaire dans la muqueuse gastrique. Des études montrent que les taux gastriques

d'IL-8 coïncident avec l'atteinte gastrique, consécutive à l'infection par *H. pylori*. Le traitement par antibiotiques et bismuth amène une chute de ces taux d'IL-8 ce qui permet la guérison de cette infection gastrique associée à une baisse de l'infiltration leucocytaire et de l'inflammation (320). En plus, une étude menée *in vitro* démontre que le traitement de monocytes humains avec le LPS dérivé d'*H. pylori* conduit à la libération d'IL-8, d'ENA-78 et de MCP-1 ce qui pourrait potentiellement impliquer ces chimiokines dans le développement de la pathologie des ulcères d'estomac (321).

Aspergillus fumigatus affecte le système respiratoire en infiltrant les muqueuses bronchiques. L'épithélium produit alors une diversité de cytokines dont l'IL-8, l'IL-6 et la MCP-1 ce qui lui permet d'induire une réponse inflammatoire envers l'agent pathogène (322). Plusieurs autres agents bactériens comme *Yersinia* (323), *Clostridium* (324), *Bacteroides* (325) et autres, ont la capacité d'induire une forte expression de chimiokines, principalement des chimiokines CXC.

1.2.4.1.2 Infections virales:

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) représente l'un des virus les plus étudiés à travers le monde. Au cours des dernières années, le rôle des chimiokines dans la progression de cette infection fut amplement étudié. Notamment, il a été démontré que les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle dans le contrôle de cette infection par la libération de puissants facteurs possédant une activité anti-VIH, soit les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β (326, 327). Leur action anti-VIH réside dans leur habileté à lier leurs récepteurs spécifiques aussi reconnus comme étant des co-récepteurs pour l'entrée du VIH dans la cellule hôte. En conséquence, le virus ne peut lier son récepteur déjà occupé et son invasion est bloquée. L'expression de CD4, quoique nécessaire, n'est pas suffisante pour l'infection à VIH (328). Récemment, quelques études ont rapporté que le CXCR4 (329) et le CCR5 (330) sont des co-récepteurs majeurs pour le VIH et une même fonction a été démontrée pour le CCR2B et le CCR3 (331, 332). L'importance *in vivo* du CCR5 dans l'infection par le VIH-1 est démontrée par la résistance envers l'infection à VIH-1 des individus possédant des allèles mutantes pour le CCR5 (333, 334). Il est intéressant de noter que ces personnes déficientes en CCR5 ne possèdent aucun problème de santé

majeur ce qui suggère que le développement d'antagonistes de récepteurs pourrait représenter une thérapie efficace et bénéfique sans danger physique. Ainsi, la RANTES et les MIP-1 α / β qui sont des agonistes pour le CCR5 bloquent l'entrée des souches primaires isolées préférentiellement lors du stade initial de l'infection (327).

Par ailleurs, la SDF-1 α qui est le ligand du CXCR4, inhibe la fusion cellulaire et la formation de syncytiums observées lors du stade tardif et symptomatique de la maladie (255, 335). L'activité anti-virale de ces chimiokines implique la compétition pour la liaison de la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe du VIH et les récepteurs de chimiokines (336-338).

Cependant, les chimiokines pourraient aussi inhiber l'entrée virale en altérant l'expression de leurs récepteurs qui sont endocytés dès la liaison de leur ligand (339). Howard et collègues (340) ont montré que le NSC 651016, un analogue de distamycine, possède une activité anti-virale importante par le blocage de l'entrée du VIH dans les cellules, *in vivo*. Le mécanisme d'inhibition de ce composé consiste en l'interférence avec les récepteurs de chimiokine. En conséquence, il y a une régulation à la baisse de ces co-récepteurs. C'est pourquoi le NSC 651016 pourrait détenir une activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Ces mêmes chimiokines CC, en plus d'agir en synergie afin d'enrayer la réplication du virus, sont aussi associées à la pathogenèse. En effet, une sécrétion sélective des MIP-1 α / β chez des monocytes infectés par le VIH-1 a été observée (341). De plus, chez des cellules microgliales et des astrocytes provenant du cerveau de patients sidatiques atteints de démence, une sécrétion élevée de chimiokines CC a été notée (341).

La kératite stromale, résultante de l'infection de la cornée par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1), se caractérise par une réponse inflammatoire intense. L'influx de leucocytes dans la cornée coïncide avec la production de la MIP-2 et la MIP-1 α (342). Cette étude menée par Tumpey et collègues (342) montre que l'administration locale d'IL-10 supprime la synthèse de chimiokines résultant en l'amélioration de la maladie.

Le cytomégalovirus (CMV) est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez des individus immunocompromis. Néanmoins, on le retrouve aussi chez 60 à 90%

des personnes normales où il demeure latent tout au long de leur vie (343). Cette infection est fréquemment accompagnée d'une infiltration de lymphocytes et de monocytes. L'infection de fibroblastes qui représentent la cible première du CMV *in vivo*, mène à une induction de la RANTES qui peut lier le récepteur de chimiokine US28 produit par le CMV. La RANTES pourrait ainsi réguler la réplication virale (344). En outre, une autre étude rapporte que les cellules endothéliales humaines, infectées par une souche clinique de CMV (1FE), peuvent recruter des neutrophiles par la sécrétion de chimiokines CXC (soit l'IL-8 et la Gro- α) et peuvent par la suite, transmettre le virus par un contact cellule-cellule lors de la migration transendothéliale des neutrophiles (345). Précisément, il semble que l'IL-8, induite en réponse à l'infection de monocytes THP-1 par le CMV, puisse augmenter la réplication virale. L'induction d'IL-8 serait consécutive à l'action du CMV sur les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. De plus, le virus a la capacité d'augmenter l'expression du gène codant pour le récepteur spécifique à l'IL-8, le CXCR1 (346).

Les infections virales amènent généralement une infiltration massive de monocytes/macrophages et de lymphocytes dans les tissus infectés. L'influenza de type A affecte particulièrement les poumons où les anticorps fournissent une certaine protection envers le développement de l'infection tandis que les cellules T sont requises pour l'éradication du virus. L'infection de monocytes humains avec l'influenza de type A conduit à une expression rapide de l'ARNm et de la protéine de la RANTES, la MIP-1 et la MCP-1, potentiellement responsables de l'influx important de leucocytes mononucléaires au site d'infection. Dans les tissus infectés, il n'y a pas de neutrophiles recrutés car ce virus semble supprimer l'expression des chimiokines CXC, soit l'IL-8 et la Gro- α (347). L'utilisation de souris déficientes en MIP-1 α , lors d'une infection avec ce virus, montre que cette chimiokine peut recruter les cellules T immunocompétentes CD8⁺ et CD4⁺, requises pour la destruction virale. Chez les souris déficientes infectées, l'infiltrat de cellules mononucléaires est significativement inférieur résultant en un oedème pulmonaire presque inexistant en comparaison avec des souris contrôles (348, 349).

La myocardite, induite chez l'homme et la souris par le coxsackie virus de type B3 (CVB3), est médiée par un mécanisme d'auto-immunité. On observe une accumulation de macrophages et de cellules polymorphonucléaires dans le coeur tôt suivant l'infection. De plus, les souris déficientes en MIP-1 α ne développent aucune inflammation cardiaque suivant l'injection de CVB3 ce qui démontre clairement l'implication de cette chimiokine dans le développement de la pathogenèse à CVB3 (348, 349).

En outre, l'IFN- γ est reconnu pour son rôle important dans le développement de la défense de l'hôte envers le virus vaccinia (350). En effet, Amichay et collègues (351) ont observé que chez des souris BALB/c infectées par ce virus, l'injection d'IFN- γ menait à une forte induction de l'expression de la mig et la crg-2, au niveau du foie et de la rate des animaux. Ce résultat est en accord avec le contrôle de cette infection observée chez des souris infectées et traitées avec des anticorps monoclonaux anti-IFN- γ .

Finalement, le paramyxovirus, le virus responsable de la maladie de New Castle qui affecte les fonctions neurologiques, induit une forte expression de la RANTES et la crg-2 chez les cellules microgliales et les astrocytes de rat. Le virus semble agir au niveau de la transcription de ces deux gènes en envoyant les signaux requis pour l'accumulation de l'ARNm (352).

1.2.4.1.3 Infections parasitaires:

De façon à contrecarrer la progression de l'infection à *Plasmodium falciparum*, la défense de l'hôte nécessite la participation de plusieurs cytokines, incluant le TNF- α et l'IL-6 (353). Cependant, la forte anémie associée à la malaria serait consécutive à l'importante sécrétion de la MIP-1 α (354). L'analyse du sang de patients souffrant d'une malaria sévère démontre que lors des épisodes septicémiques, l'IL-8 contribue à une forte réponse immune au détriment de l'hôte par l'induction d'une importante accumulation de neutrophiles exacerbant la réponse inflammatoire et en conséquence, la sévérité de la maladie. Au contraire, la MIP-1 α joue un rôle majeur dans la phase tardive de la réponse immune en induisant un recrutement de macrophages et de lymphocytes. Amichay et collègues (351) en plus de démontrer l'induction de la mig et la crg-2/IP-10 chez des souris BALB/c par le virus *vaccinia* en réponse à l'IFN- γ recombinant, ont aussi rapporté

un phénomène similaire pour les parasites *Plasmodium yoelii* et *Toxoplasma gondii* chez des souris BALB/c (*P. yoelii*) et C57BL/6 (*T. gondii*).

Par ailleurs, il a été rapporté que le parasite *Leishmania major* lorsque phagocyté par sa cellule hôte, le macrophage, induit une expression rapide de certaines chimiokines, *in vitro*, soit l'IL-8 et la MCAF/MCP-1 (137, 355). D'un autre côté, l'analyse du sérum de patients atteints de leishmaniose cutanée montre de hauts taux circulants de la MCP-1 qui activerait le macrophage (se traduisant par la hausse de l'explosion respiratoire du macrophage qui est un moyen de défense pour la destruction intracellulaire des amastigotes) et recruterait un grand nombre de cellules T afin de permettre la guérison tandis qu'une forte production de la MIP-1 α a été décelée chez les patients souffrant de la LCD (64), résultant possiblement en la non-guérison de l'infection car la MIP-1 α est reconnue pour inhiber la prolifération des cellules T médiée par le CD3 et bloquer la production d'IL-2 (64). De plus, cette chimiokine est connue pour sa faible capacité à activer les défenses des macrophages. La présence de la MIP-1 β , la RANTES, l'I-309 et l'IL-8 a été peu ou pas détectée dans les deux cas (64). Récemment, Cotterell et collègues (71) ont associé l'infection à *L. donovani* chez des souris BALB/c à l'augmentation de l'expression d'IP-10, de MCP-1 et de MIP-1 α au niveau du foie des animaux.

Le développement de la maladie de Chagas repose l'infection des macrophages par le *Trypanosoma cruzi*. L'IFN- γ et le TNF- α sont reconnus pour leur habileté à stimuler l'activité anti-trypanosome du macrophage. Toutefois, Lima et collègues (356) ont observé que l'ajout de chimiokines recombinantes (RANTES, MIP-1 α/β) à des macrophages humains infectés par le *T. cruzi* augmente significativement la capture et la destruction intracellulaire du parasite par les macrophages. La RANTES aurait le plus grand potentiel comme agent anti-parasitaire.

De plus, l'infection des souris BALB/c avec le parasite *Trichinella spiralis* montre de hauts taux de la MCP-1 dans le sérum après 23 jours d'infection. Selon la concentration de larves inoculées (100 ou 200 larves), la sécrétion de la MCP-1 s'observe au jour 33 et au jour 23, respectivement, pour diminuer par la suite. Néanmoins, le rôle exact de la MCP-1 dans la trichinellose reste encore à déterminer (357).

Les plérocercoides de *Spirometra erinacei* proviennent de cultures de serpent et causent une sparganose. Des produits excrétés/sécrétés par ces plérocercoides permettraient la promotion de l'expression précoce de chimiokines (IP-10, MCP-1/JE, Gro- α /KC) afin d'accompagner leur entrée dans la cavité péritonéale d'un infiltrat de leucocytes. Cependant, ils supprimeraient cette même réponse chimiotactique dans une phase plus tardive dans le but de réprimer la réponse inflammatoire à long terme (352).

En outre, la réponse granulomateuse induite par les oeufs de *Schistosoma mansoni*, un parasite helminthe, se caractérise par une réponse T_H2 dominante (IL-4, IL-5 et IL-10). Les nodules lymphoïdes drainants ainsi que les macrophages isolés des granulomes démontrent une forte expression de la MCP-1. L'utilisation d'anticorps anti-MCP-1 chez des souris CBA/J infectées par *S. mansoni* résulte en une diminution à plus de 30% de la taille des granulomes ce qui implique la contribution de la MCP-1 pour le développement de la réponse inflammatoire à médiation T_H2 (359, 360).

L'inflammation de la cornée résulte en un affaiblissement visuel majeur lors de l'infection à *Onchocerca volvulus*. Le traitement par l'IL-12 de la cornée de souris BALB/c infectées produit une expression élevée de chimiokines CXC et CC, reconnues pour leur action chimiotactique envers les cellules mononucléaires et les éosinophiles (incluant IP-10, MIP-1 α/β , MCP-1/JE, RANTES et éotaxine). Ainsi, l'IL-12 exacerbe la pathologie associée à *O. volvulus* en augmentant l'expression de chimiokines et en conséquence, le recrutement de cellules inflammatoires (361).

Tableau 7: Modulation de l'expression de chimiokines par les pathogènes

Pathogène	Action	Résultat sur l'infection
<u>Bactéries-Levures</u>		
<i>S. typhimurium</i>	↑ IL-8, PEEC	F
<i>L. monocytogenes</i>	↑ MCP-1	C
<i>K. pneumoniae</i>	↑ MIP-2	F
<i>C. neoformans</i>	↑ MCP-1	F
<i>M. tuberculosis</i>	↑ MIP-1 α , MCP-1	F
<i>S. aureus</i>	↑ IL-8	F
<i>P. aeruginosa</i>	↑ éotaxine, IP-10, MCP-1, MIP-1 α/β , MIP-2, RANTES	F
<i>B. burgdorferi</i>	↑ RANTES, MCP-1, IL-8, IP-10, Gro- α	F
<i>C. trachomatis</i> , <i>C. psittaci</i>	↑ IL-8, Gro- α	C
<i>N. gonorrhoeae</i>	↑ IL-8, MCP-1	C
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	↑ IL-8	C
<i>H. pylori</i>	↑ IL-8, ENA-78, MCP-1	F
<i>A. fumigatus</i>	↑ IL-8, MCP-1	F
<u>Virus</u>		
VIH	RANTES, MIP-1 α/β , SDF-1	C
HSV-1	↑ MIP-2	F
CMV	↑ RANTES, IL-8, Gro- α	F
Influenza type A	↑ RANTES, MCP-1, MIP-1 α ↓ IL-8, Gro- α	F
Coxsackie virus type B3	↑ MIP-1 α	F
Vaccinia virus	↑ mig, IP-10	C
Paramyxovirus	↑ RANTES, IP-10	F
<u>Parasites</u>		
<i>P. falciparum</i>	↑ MIP-1 α , IL-8	F
<i>L. major</i>	↑ IL-8, MCP-1, MIP-1 α	F
<i>L. donovani</i>	↑ IP-10, MCP-1, MIP-1 α	F
<i>T. cruzi</i>	RANTES, MIP-1 α/β	C
<i>T. spiralis</i>	↑ MCP-1	?
<i>S. erinacei</i>	↑ IP-10, MCP-1	F
<i>S. mansoni</i>	↑ MCP-1	F
<i>O. volvulus</i>	↑ IP-10, MIP-1 α/β , MCP-1, RANTES, éotaxine	F

* F= favorable à l'infection; C= contrôle de l'infection

1.2.4.2 Les chimiokines et le développement de pathologies:

1.2.4.2.1 L'arthrite rhumatoïde:

Cette maladie auto-immune se caractérise par l'atteinte des articulations et de l'espace synovial causée par une inflammation consécutive à un fort recrutement leucocytaire impliqué dans la prolifération des cellules synoviales et l'érosion des os. Plusieurs études ont évalué le rôle des chimiokines lors d'une telle pathologie. Les cellules constituant le tissu de l'articulation produisent les chimiokines MCP-1 (362), MIP-1 α (363) et RANTES (364) qui sont responsables du recrutement des cellules mononucléaires dans le synovium inflammé. L'expression des chimiokines CXC a aussi été étudiée. Le liquide synovial de patients atteints d'arthrite renferme une activité chimiotactique envers les neutrophiles (365). Le traitement du liquide synovial avec des anticorps neutralisants envers l'IL-8 ou l'ENA-78 occasionne la diminution de l'activité chimiotactique envers les neutrophiles d'approximativement 57% et 42%, respectivement (365). Par ailleurs, d'autres études rapportent la détection de taux significatifs de la Gro- α et de la Gro- β chez les fibroblastes synoviaux isolés de patients (366, 367). Comme le recrutement de neutrophiles et de cellules mononucléaires dans les articulations inflammées représente un événement crucial pour le développement de l'arthrite, l'immunisation passive intra-péritonéale avec des anticorps anti-MIP-1 α ou anti-MIP-2 chez des souris a été analysée. Cette immunisation passive résulte en une réduction significative de l'arthrite rhumatoïde, provoquée par l'injection intrapéritonéale de complexes immuns, soit des anticorps neutralisants F(ab')₂ ce qui suggère que le ciblage individuel de chimiokine pourrait constituer une approche thérapeutique afin de contrecarrer l'arthrite rhumatoïde (368, 369).

1.2.4.2.2 L'inflammation du poumon et les allergies:

L'épithélium alvéolaire pulmonaire compose la surface interagissant avec le monde extérieur. Les cellules épithéliales alvéolaires sont très étudiées car leur localisation est idéale pour influencer les réponses immunes et inflammatoires. Simon et collègues (370) ont rapporté la libération de la MCP-1, la RANTES et l'IL-8 par les

cellules épithéliales alvéolaires de rat. L'inoculation intra-trachéale de bléomycine chez des rats Winstar résulte en une atteinte du poumon accompagnée par une importante accumulation de macrophages. La libération de la MCP-1 par les macrophages alvéolaires et interstitiels conduit à l'accumulation massive de macrophages (371). Une autre étude a montré que les cellules épithéliales des bronches humaines expriment de façon constitutive l'IL-8 ainsi que la MCP-1. Le traitement de ces cellules avec l'IFN- γ ou l'IL-1 β amène une surexpression de la MCP-1 et de l'IL-8. Au contraire, l'ajout de glucocorticoïdes conduit à un effet bénéfique sur la maladie dû en partie à son effet suppresseur sur l'expression des chimiokines (372).

L'étude du syndrome de détresse respiratoire (SDRA) chez le rat a permis d'identifier l'homologue chez le rat de l'IP-10 humain, la mob-1. L'injection intra-trachéale de la mob-1 recombinant chez le rat a démontré l'implication de la mob-1 dans le développement de la pathogenèse associée au SDRA (373). En outre, l'étude menée par Matsumoto (374) a associé ce type de pathologie à l'expression d'IL-8 puisque le traitement avec des anticorps anti-IL-8 prévient le développement de la pathologie.

L'inflammation allergique des voies respiratoires affecte une grande proportion de la population mondiale et ces désordres incluent l'asthme, l'éosinophilie pulmonaire et la mucomyose broncho-pulmonaire. L'asthme implique une infiltration de leucocytes dans les bronches et les voies respiratoires (375). Les éosinophiles sont les cellules principalement responsables pour l'induction des bris tissulaires de la muqueuse des bronches (376). L'étude de Lukacs (377) a précisé l'implication de la MIP-1 α et la RANTES dans le recrutement des éosinophiles lors d'une telle inflammation. Par ailleurs, la neutralisation de diverses chimiokines CC (éotaxine, RANTES, MCP-5 et MCP-1) chez des souris C57/BL6 sensibilisées à l'ovalbumine a permis d'établir clairement leur rôle majeur dans le développement de l'inflammation allergique des voies respiratoires (377-380). De plus, les lavages broncho-alvéolaires de patients souffrants d'asthme montrent des taux élevés de la MIP-1 α (380).

1.2.4.2.3 Atteintes de la peau:

Le psoriasis est une maladie chronique de la peau caractérisée par une inflammation du derme et de l'épiderme qui est associée à une infiltration intense de neutrophiles et la prolifération active des kératinocytes épidermaux. Dans les lésions de psoriasis, les kératinocytes sécrètent l'IL-8 qui serait responsable du fort recrutement dans les lésions de leucocytes, particulièrement des neutrophiles. Des cellules T libérant des cytokines T_{H1} (IFN- γ , IL-2) ont aussi été observées au site d'inflammation (381, 382). De plus, l'IL-8 résulte en la formation de microabcès neutrophiliques de la peau (383).

Kaplan et collègues (384) ont observé que la production locale d'IFN- γ par les cellules T dans un infiltrat dermal résulte en la formation d'IP-10 au niveau du derme et de l'épiderme. L'implication d'IP-10 dans la réponse retardée d'hypersensibilité a aussi été rapportée par Enk (385).

Chez le rat, l'injection de cristaux du permanganate de potassium induit la génération de tissus granulomateux. Chez les animaux, la calcification des tissus, résultante de l'inflammation chronique, conduit à l'expression du gène de la MCP-1 qui peut potentiellement participer à la formation du granulome (386).

1.2.4.2.4 La formation de tumeurs et de cancers:

La masse cellulaire d'une tumeur solide est constituée généralement de plus de 80% de macrophages. Ce fort contenu en macrophages découle d'un recrutement soutenu des monocytes circulants qui subissent une maturation en macrophages, *in situ*. Graves et collègues (387) ont associé l'expression de la MCP-1 par les cellules malignes humaines à la formation de la tumeur. De plus, l'analyse des lésions de mélanomes humains a permis de détecter la présence des MGSA/Gro- α,β,γ et du CXCR2. Il a été rapporté que l'expression constitutive de ces chimiokines chez des mélanocytes murins résulte en la formation d'une tumeur dans 100% des cas et ce phénomène est bloqué par l'ajout d'anticorps dirigés envers les protéines MGSA/Gro (388). En opposition, les chimiokines peuvent aussi participer à l'éradication de ces tumeurs. Notamment, chez des souris BALB/c porteuses de tumeurs RENCA ou CT26, le traitement à l'IL-12 amène une régression complète de la tumeur. Ce phénomène est accompagné par la synthèse d'IP-10

par les cellules tumorales. Cette expression d'IP-10 est accompagnée par le recrutement au site de la tumeur de cellules T CD8⁺ qui seront subséquentement activées pour leur fonction cytolytique (389). L'étude de Zhang (390) a démontré que dans la majorité des cancers colo-rectaux, il y a une surexpression de la chimiokine mob-1 (homologue chez le rat d'IP-10 humain).

1.2.4.2.5 La péritonite:

La migration des neutrophiles dans la cavité péritonéale représente un important mécanisme de défense de l'hôte contre l'invasion bactérienne (391). Mercer-Jones et collègues (392) ont démontré que les mastocytes ainsi que la production de la MIP-2 sont essentiels pour la migration des cellules polymorphonucléaires dans la cavité péritonéale en réponse à une injection intra-abdominale. Plus précisément, il apparaît que la MIP-2 facilite ce processus en augmentant la libération du TNF- α .

1.2.4.2.6 L'athérosclérose et la maladie de Kawasaki:

Les lésions observées lors de l'athérosclérose se composent en partie de « foam cells » (macrophages). La signalisation menant au recrutement des monocytes/macrophages aux vaisseaux sanguins est inconnue. Néanmoins, la création de souris déficientes en CCR2 a permis d'évaluer le rôle joué par la MCP-1 dans un tel mécanisme. Ainsi, l'absence sélective de CCR2 chez les souris résulte en une diminution de la formation de lésions athérosclérotiques précoces et son expression serait possiblement augmentée par les lipides oxydés (393).

La maladie de Kawasaki est diagnostiquée par une vasculite systémique affectant particulièrement les artères coronariennes. Elle représente la cause majeure des maladies cardiaques chez les enfants (394). Les études immunohistochimiques des tissus cardiaques de patients morts d'une atteinte fatale associent l'expression de la MCP-1 (mais non d'IL-8 et de la MIP-1 α) avec la distribution de l'inflammation aiguë car les patients ont des hauts taux circulants de la MCP-1. Cependant, le blocage de l'activité de la MCP-1 par des immunoglobulines de type γ atténue le développement de la vasculite (395).

1.2.4.2.7 La glomérulonéphrite et la néphropathie:

La glomérulonéphrite se caractérise par un important influx de neutrophiles dans les glomérules ce qui entraîne de sérieux dommages tissulaires. En conséquence, on observe un défaut de fonctionnement du rein. L'étude chez le rat menée par Feng (396) montre que l'expression de la MIP-2 coïncide avec l'influx de neutrophiles dans le glomérule. En plus, l'injection d'anticorps anti-MIP-2 réduit à 40% l'influx de neutrophiles qui se traduit indirectement par une réduction majeure dans la protéinurie anormale. D'autres études associent cette forte accumulation de neutrophiles à la production locale d'IL-8 par les cellules résidentes dans le glomérule et les cellules infiltrantes (397, 398).

La néphropathie IgA implique aussi les leucocytes pour le développement de sa pathologie. Les taux urinaires de la MCAF/MCP-1 sont élevés lors de l'infection chronique où il y a une prolifération des cellules mésangiales et une infiltration de macrophages. Au contraire, l'IL-8 urinaire demeure élevée lors de l'infection aiguë, suivant la prolifération endocapillaire glomérulaire et l'hématurie. Ces chimiokines sont impliquées dans des phases distinctes de la pathogenèse de la néphropathie. La MCAF/MCP-1 est exprimée chez les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales tubulaires et les cellules mononucléaires dans les lésions interstitielles alors qu'IL-8 s'observe en partie dans le glomérule. Ceci peut s'expliquer par le recrutement et l'activation de sous-groupes particuliers de leucocytes selon la chimiokine en cause (399, 400).

1.2.4.2.8 La maladie coeliaque:

L'épithélium intestinal joue un rôle important dans la reconnaissance d'agents pathogènes et l'influx de cellules inflammatoires vers la muqueuse. La maladie coeliaque désigne les chimiokines produites par l'épithélium comme des cibles clés pour une thérapie car des études (401, 402) rapportent que l'IL-8, présente dans les entérocytes et les cellules inflammatoires de la muqueuse, agit comme principal agent recruteur de neutrophiles dans la muqueuse non-inflammée. De plus, la production de la MCP-1 est grandement augmentée lors de la maladie coeliaque (403).

1.2.4.2.9 Les maladies neurologiques:

L'inflammation du système nerveux central (SNC) résulte d'un traumatisme quelconque et se compose généralement de phagocytes mononucléaires (404). Par exemple, les macrophages et les cellules microgliales représentent les répondants majeurs de la dégénération des neurones dans le SNC suivant l'atteinte excitotoxique induite par l'injection systémique de l'acide kainique (405). Les cellules astrogliales, présentes dans le SNC, expriment diverses chimiokines (MCP-1, IP-10 et Gro- α) lors d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (406-408). Ransohoff (408) a particulièrement étudié le rôle de la MCP-1 et de la RANTES dans le développement de diverses pathologies atteignant le SNC par percussion. Ainsi, l'expression de la MCP-1 accompagne la forte accumulation de macrophages observée lors de la blessure de la colonne vertébrale et l'axotomie du nerf sciatique. Au contraire, l'expression de la RANTES est associée avec un important recrutement de cellules T observé lors de la neurite auto-immune expérimentale et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. L'expression de la MCP-1, l'IP-10, la RANTES, les MIP-1 α/β , la MCP-3 et la Gro- α serait observée juste avant l'apparition des cellules infiltrantes dans le SNC (406, 409, 410).

1.2.5 La signalisation intracellulaire menant à l'induction des chimiokines

Les chimiokines représentent une cible thérapeutique de choix dû à leur implication dans le développement d'une grande variété de pathologies. Ainsi, afin de contrecarrer leur action, il devient nécessaire de discerner les diverses voies de signalisation menant à leur induction. Certains agents possédant la capacité d'induire un tel mécanisme sont aujourd'hui bien identifiés (LPS, TNF- α , IL-1 β) toutefois, les voies de signalisation conduisant à l'expression des gènes de chimiokines sont en majorité inconnues.

La transmission des signaux intracellulaires implique la participation de diverses PTPs et PTKs qui forment une cascade d'événements biochimiques conduisant à l'activation des gènes chez la cellule. Bien que la PI3-kinase représente un élément essentiel chez un grand nombre de ces cascades, l'étude menée par Pendl (411) rejette

l'implication de la PI3-kinase dans l'induction de l'expression des gènes ainsi que dans la sécrétion des protéines de chimiokines par l'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques, soit la wortmannin et la demethoxyviridine chez des mastocytes murins où l'activation de la signalisation dépendante d'IP₃ est déclenchée par la liaison du récepteur FcεRI. Cependant, leurs résultats associent les voies dépendantes de la MAP kinase à l'activation des gènes de chimiokines chez ces cellules.

La découverte d'une nouvelle chimiokine observée chez le poulet, la 9^{E3}/CEF4, qui a une grande homologie avec l'IL-8 et la Gro-α humaines, a permis de démontrer que l'activation du gène 9^{E3}/CEF4 par la thrombine chez les fibroblastes de poulet requerrait l'activation de PTKs (incluant c-src et le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*)) plutôt que les protéines ser/thr kinases (PKC et PKA) (412). Au contraire, chez des monocytes humains, l'expression du gène MCP-1 induite par la densité de la masse cellulaire semble nécessiter les voies de signalisation médiées par les PTKs et la PKC. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de PTKs (génisteine, herbimycine A) et l'inhibiteur de PKC (H-7) supprime complètement la transcription de ce gène (413). De plus, il semble que la PKC joue un rôle critique dans la phosphorylation d'une protéine de 70 kDa sur ses résidus tyr qui à son tour, peut médier l'expression du gène de MCP-1 (413). Hanazawa et collègues (414) ont rapporté que l'induction du gène de MCP-1 par le TNF-α chez les cellules MC3T3 E1 (clones ostéoblastiques) s'effectue via la voie de signalisation dépendante de la PKC. Une autre étude démontre un phénomène similaire où l'ajout de LPS à des cellules endothéliales en culture conduit à l'expression de MCP-1 médiée par diverses voies de signalisation, notamment la voie dépendante de la PKC, la voie dépendante des PTKs ainsi qu'une troisième voie non-déterminée (415).

Le *paramyxovirus* neurotrophique (virus de New Castle) induit l'expression des gènes de RANTES et de crg-2/IP-10 chez des cellules microgliales et les astrocytes de rat en utilisant deux voies de signalisation différentes. L'induction de RANTES est régulée par une voie dépendante de PTKs et à niveau moindre, via une activation PKC/PKA car l'addition d'inhibiteurs de PTKs bloquent complètement l'expression de RANTES tandis que les inhibiteurs de PKC/PKA sont moins efficaces (suppression partielle). Au contraire, l'expression de crg-2 est entièrement dépendante de l'activité de la PKC car

l'inhibition de la PKC enrayerait totalement son induction alors que tous les autres inhibiteurs utilisés (inhibiteurs de PTKs et inhibiteur de la PKA) l'affectent peu ou pas (416).

Par ailleurs, il semble que la stimulation de monocytes par l'IL-1, le TNF- α et le LPS requiert une synthèse de protéines *de novo* pour l'expression du gène de la MCP-1 car l'étude de Colotta (417) a rapporté que l'ajout du cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, supprime entièrement l'induction du gène.

Quoique la signalisation intracellulaire menant à l'expression des gènes de chimiokines demeure toujours sous étude, plusieurs facteurs de transcription ont été associés à la transcription de ces gènes. En effet, il semble que la liaison de divers facteurs de transcription dans les régions promotrices des gènes de chimiokines mène à des mécanismes de régulation variables en fonction du type cellulaire et du stimulus employé. Par exemple, l'ajout d'H₂O₂ induit la transcription du gène d'IL-8 dépendante du facteur AP-1 tandis que la stimulation par le TNF- α et le virus respiratoire syncytial (RSV) implique l'activation du NF- κ B (418-419). Le gène d'IP-10 contient des sites de liaison pour NF- κ B (420). En effet, Majumder et collègues (420) ont montré *in vitro* chez des cellules humaines de fibrosarcome U2A que ces sites de liaison, localisés sur le gène d'IP-10, lient l'homodimère p65 de NF- κ B.

Par ailleurs, la transcription de MGS-A/Gro- α chez des cellules de mélanomes Hs294T implique une forte activité d'I κ B. Effectivement, l'expression du gène de Gro- α est consécutive à une forte augmentation de la dégradation d'I κ B et de son activité ce qui entraîne une importante translocation de NF- κ B dans le noyau (421). Awane et collègues (422) ont montré aussi que des kinases induites par NF- κ B (c-Jun et p38) vont induire l'expression du gène de CINC/KC chez des cellules épithéliales IEC-6 de rat stimulées par l'IL-17, le TNF- α et l'IL-1 β . Les chimiokines MCP-1 et éotaxine possèdent elles-aussi, des séquences consensus dans leur promoteur, aptes à interagir avec les facteurs nucléaires NF- κ B et AP-1 (423, 424). Des mutations ou des délétions dans les sites « NF- κ B-like » ou des mutations dans les sites de liaison d'AP-1 résultent en une diminution drastique de l'activité du promoteur de la MCP-1 chez les cellules endothéliales humaines stimulées à l'IL-1 β (423).

Rel B qui est aussi un membre de la famille NF- κ B, est un important régulateur de l'expression des chimiokines chez les fibroblastes car la stimulation par le LPS de fibroblastes déficients en RelB résulte en une production persistante et dramatique de plusieurs chimiokines (RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10, MCP-1 et KC/CINC). En conséquence, ces fibroblastes déficients en RelB induisent un important recrutement de granulocytes dans les tissus, *in vivo* (425). La chimiokine mig qui similairement à l'IP-10 est induite en réponse à l'IFN- γ , contient dans son gène un nouveau facteur de transcription, le RF-1 (*IFN gamma responsive factor-1*) qui se lie à l'élément RE-1 γ (*IFN-gamma responsive enhancer-1*) rapidement suivant une stimulation cellulaire afin de médier la transcription du gène mig (426). Finalement, l'étude menée par Song et collègues (427) a montré l'existence d'un nouveau facteur de transcription associé à l'activation du gène RANTES chez des cellules T, soit le RFLAT-1 (**R**ANTES **F**actor of **L**ate Activated **T** Lymphocytes-1).

1.3 BUTS DE L'ÉTUDE

Le parasite intracellulaire *Leishmania* affecte plus de 15 millions d'individus dans le monde par ses diverses pathologies (cutanée et viscérale). En conséquence, il devient nécessaire de mieux comprendre les événements inflammatoires qui surviennent dès le contact initial du parasite avec son hôte afin de permettre l'élaboration d'une nouvelle thérapie anti-leishmaniose ou encore, le développement d'un vaccin performant. Au cours des dernières années, plusieurs études ont défini la séquence du processus inflammatoire. Des études ont clairement démontré que les chimiokines sont de puissants agents chimioattractants et elles sont de plus en plus associées avec le développement de l'inflammation. En effet, elles jouent un rôle prépondérant avec les intégrines dans l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales suivant l'action des sélectines en formant un gradient de concentration (216) afin de guider des sous-groupes particuliers de leucocytes au site d'invasion (217). Une étude portant sur la détermination précise des premiers médiateurs cellulaires induits en réponse au *Leishmania* dans un modèle *in vivo* est requise pour une meilleure compréhension du développement des leishmanioses. La majorité des études concernant l'activation des chimiokines par ces parasites a été effectuée *in vitro* (123, 349). Récemment, une étude rapportait que le parasite *L. donovani* modulerait *in vivo* certains gènes de chimiokines dans le foie de souris BALB/c (71). Néanmoins, jusqu'à maintenant, aucune étude comparant les deux types de leishmanioses n'a été effectuée *in vitro* et *in vivo*. En plus, il est important de noter que la plupart des études a été effectuée *in vitro*, ne fournissant aucune information précise sur les interactions entre les divers types cellulaires et les mécanismes inflammatoires modulant les chimiokines. Ainsi, l'identification et le rôle des molécules et événements inflammatoires menant au développement d'une leishmaniose cutanée ou viscérale restent toujours à déterminer. En première partie, cette étude avait pour but d'évaluer si la cascade des événements cellulaires et inflammatoires impliqués dans l'induction de la pathologie cutanée (*L. major*) est similaire à celle retrouvée en réponse au *L. donovani* pour la leishmaniose viscérale, utilisant un modèle *in vivo* de la poche d'air chez la souris. Ce modèle murin nous permet de recréer le site d'inoculation du vecteur, au

niveau de la peau. L'injection d'air stérile sous-cutanée forme une poche, composée de fibroblastes et de macrophages permettant l'injection de l'agent stimulant et par la suite, la récolte des échantillons pour l'évaluation de divers paramètres reliés à la réponse inflammatoire (soit le nombre cellulaire recruté, la population cellulaire, l'expression de gènes de chimiokines et de leurs récepteurs au niveau des cellules composant le tissu de la poche ainsi que les cellules recrutées dans l'exsudat de la poche et la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) dans l'exsudat). Ainsi, cette approche nous permet d'étudier les événements précoces se produisant dans les premiers instants de l'infection pouvant fournir l'explication sur les différentes pathologies résultantes de l'infection par ces deux espèces de *Leishmania*.

Notre étude a permis d'analyser la modulation des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ainsi que de diverses chimiokines (lymphotactine, éotaxine, RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10, MCP-1 et TCA-3) dans le développement de la réponse inflammatoire induite par ces parasites.

Au cours de notre étude, nous nous sommes aussi intéressés à discerner les voies de signalisation conduisant à l'activation de certains médiateurs de l'inflammation (les chimiokines et la PGE₂), lors de l'infection de macrophages *in vitro*. L'utilisation de composés bloquant l'activité des PTPs, en l'occurrence les composés peroxovanadiums (bpV(phen)) (176), s'est avéré être un excellent outil nous permettant d'évaluer le rôle des PTPs dans la modulation de l'inflammation chez notre modèle murin de migration cellulaire de la poche d'air.

De plus, quelques études ont rapporté l'implication de certaines PTKs et de la PKC dans l'activation des gènes de la 9^{E3}/CEF4 (homologue d'IL-8 et de Gro) (406, 407) et de la MCP-1 (408), *in vitro*. Jusqu'à présent, peu d'études ont porté sur l'identification de la signalisation cellulaire menant à l'induction des gènes de chimiokines. Comme le parasite *Leishmania* a été associé à l'induction de divers gènes de chimiokines, il est nécessaire de déterminer précisément les voies de signalisation conduisant à l'induction de ces gènes. De meilleures connaissances à ce sujet pourraient permettre le développement d'anti-inflammatoires et d'anti-parasitaires régulant l'activité des chimiokines en agissant au niveau de la signalisation. Les résultats, obtenus *in vivo* en

réponse au traitement bpV(phen) dans un modèle de la poche d'air de souris, nous ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait une implication des PTPs dans la régulation de la voie de signalisation menant à l'induction de chimiokines par le macrophage afin d'élaborer une réponse inflammatoire adéquate envers un stimulus. Dans ce troisième volet de notre étude nous étions intéressés à déterminer le rôle joué par les PTPs dans l'induction de l'expression des gènes de chimiokines par le macrophage grâce à l'utilisation du composé bpV(phen). De plus, la génération de macrophages dérivés des souris déficientes (me) ou non (Lmme) en SHP-1 nous a permis d'évaluer précisément l'implication de cette PTP dans l'induction des gènes de chimiokines car la SHP-1 est reconnue pour sa fonction dans la régulation négative de plusieurs voies de signalisation (159).

En dernier lieu, nous voulions déterminer les voies de signalisation impliquées dans la production de la PGE₂, associée à l'infection par le *Leishmania*. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont rapporté une importante libération de la PGE₂ suivant l'infection à *L. donovani* (122-124). La PGE₂ serait possiblement associée à l'exacerbation de la pathogénèse à *Leishmania* de par à son action immunosuppressive et en conséquence, la détermination de la cascade biochimique précise impliquée dans sa génération pourrait permettre de contrôler le développement de certaines pathologies occasionnées lors de cette infection. L'utilisation de divers inhibiteurs, notamment l'indométhacine (un agent qui inhibe principalement la COX-2), la génistéine (un inhibiteur des PTKs) et le H7 (un inhibiteur de la PKC) vont nous permettre de préciser les voies de signalisation en cause dans un modèle *in vitro* utilisant une lignée cellulaire humaine (les cellules U937 différenciées en macrophages par un traitement au PMA).

En somme, toutes ces études vont permettre de mieux caractériser les événements inflammatoires se produisant lors de l'infection à *Leishmania* et particulièrement, de discerner les diverses voies de signalisation modulées suite à l'infection conduisant à l'activation de divers médiateurs impliqués dans le déclenchement de sa pathologie.

CHAPITRE 2

LE RECRUTEMENT CELLULAIRE INDUIT PAR LE *LEISHMANIA* LORS DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE PRÉCOCE: MODULATION DES MÉDIATEURS PRO-INFLAMMATOIRES

2.1 RÉSUMÉ

Nous avons évalué si les espèces de *Leishmania*, responsables des leishmanioses cutanées (*Leishmania major*, Lm) et leishmanioses viscérales (*Leishmania donovani*, Ld) pouvaient moduler de façon différente la réponse inflammatoire *in vivo* qui possiblement, favorisera le développement de leurs pathologies respectives. Les études, utilisant le modèle murin à poche d'air, ont démontré que l'injection de *Leishmania* dans la poche menait à une accumulation rapide et transitoire d'une population mixte de leucocytes (neutrophiles, macrophages, éosinophiles) où le Lm recrutait 31 fois plus de leucocytes par rapport au contrôle en comparaison de 7 fois pour le Ld. Nous avons aussi démontré que le parasite Lm représentait le meilleur agent inducteur -au-delà de l'infection à Ld- des cytokines pro-inflammatoires (TNF-1 α et IL-1 β) et de l'expression des chimiokines (IP-10, MIP-1 α/β et RANTES) dans l'exsudat de la poche tandis que le Ld induisait une meilleure expression de l'éotaxine, les MIP-1 α/β et la MIP-2 dans le tissu composant la poche. Il est intéressant de noter une induction significative de l'expression des gènes des récepteurs de chimiokines (CCR2, CCR3, CCR5) par le Lm comparé au Ld. Nos résultats suggèrent que le Lm est un meilleur agent inducteur de la réponse inflammatoire précoce qui pourrait favoriser la progression de la leishmaniose cutanée.

***LEISHMANIA*-INDUCED CELLULAR RECRUITMENT
DURING EARLY INFLAMMATORY RESPONSE:
MODULATION OF PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS**

Claudine Matte and Martin Olivier*

Centre de Recherche en Infectiologie and Département de Biologie Médicale,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Faculté de Médecine,
Université Laval, Sainte-Foy (Québec) Canada G1V 4G2

* Address correspondence to:

Martin OLIVIER, Ph.D.
Centre en Recherche en Infectiologie, RC-709
Centre Hospitalier Universitaire de Québec
Pavillon CHUL,
2705 boul. Laurier
Ste-Foy (Québec), Canada– G1V 4G2
Phone: (418) 654-2705.–_Fax: (418) 654-2715.
E-mail: martin.olivier@crchul.ulaval.ca

Running title: *In vivo- Leishmania-induced chemokine gene expression.*

SUMMARY

In the present study, we investigated whether *Leishmania* spp., the etiological agent of cutaneous (*Leishmania major*, Lm) and visceral (*Leishmania donovani*, Ld) leishmaniasis, could differentially elicit an inflammatory reaction *in vivo* possibly favoring the development of their reciprocal pathogenesis. Studies using a murine air pouch system revealed that injection of *Leishmania* into pouches led to a rapid and transient accumulation of a mixed population of leukocytes (neutrophils, macrophages, eosinophils) and that Lm recruited 31-fold more leukocytes over control in comparison to Ld (7-fold). Lm infection proved to be a better inducer than Ld of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (IP-10, MIP-1 α/β , and RANTES) gene expression in pouch exudates; whereas Ld induced a greater expression of eotaxin, MIP-1 α/β , and MIP-2 in the pouch lining. Of note, Lm infection was accompanied by a significant increase in leukocyte chemokine receptor genes expression (CCR2, CCR3, CCR5) when compared with Ld infection. Our data suggest that Lm is a better inducer of early inflammatory events that may favor the progression of cutaneous, over visceral, leishmaniasis.

INTRODUCTION

The intraphagocyte protozoan parasites of the genus *Leishmania* are transmitted to man and various mammals through the bite of a sandfly vector. Fifteen million people worldwide are infected with this parasite and more than 400 000 new cases are reported annually [1]. *Leishmania* infections are the cause of several pathologies ranging from cutaneous and muco-cutaneous lesions to the deadly visceral disease. Transmission of *L. donovani* alone generally causes redness at inoculation sites before migrating via the lymphatic and blood systems toward the liver and spleen; while *L. major*-infected individuals will develop skin lesions and ulcerations due to chronic inflammation and cell infiltration into the dermal layers. This inflammatory reaction will usually limit the pathogen to the inoculation site. Modulation of proinflammatory cytokines by *Leishmania* spp. in *in vitro* and *in vivo* experiments has been previously reported [2-7]. It has been shown that *Leishmania* infections induce TNF- α production [5, 6]. IL-1 β generation was abolished by *L. donovani* infection *in vitro*, and *in vivo* [2, 3, 7], whereas it was induced by *L. major* infection [4]. Together, these observations clearly established that various species of *Leishmania* could differentially modulate important mediators of inflammatory response, the proinflammatory cytokines. In addition, it is now well-documented that these cytokines play an important role in the modulation of chemokines which are recognized for their pivotal role in cell recruitment and the promotion of the inflammatory reaction [8].

The principal role of the members of the vast chemokine gene family is to attract and activate leukocytes. Chemokines are polypeptides of low molecular weight (8 to 11 kDa) which have been grouped according to the position of the cysteine residues in the N-terminus portions into four subfamilies: C-X-C, C-C, C and C-X₃-C [9-12]. While each type of these molecules attract competent cells to the inflammatory site, their actions are specific to particular cellular groups [13]. For example, members of the C-X-C class (IL-

8, Gro- α (KC, murine homologue), PF-4) act mainly on neutrophils, whereas members of the C-C class such as MCP-1 (or JE, the murine homologue), MIP-1 α/β , and RANTES, act upon a larger group of cells, including monocytes, basophils, eosinophils and lymphocytes, but not neutrophils. Lymphotactin, the only C chemokine, acts solely on specific sub-groups of B and T lymphocytes [14]. Recently, a C-X₃-C branch member termed fractalkine was reported to attract monocytes, neutrophils and T lymphocytes [11, 12], although this remains controversial. Chemokines are secreted in a stimulus-specific manner from a variety of cell types, including leukocytes, fibroblasts, epithelial cells and endothelial cells [15-18]. As mentioned above, chemokines represent some of the most important mediators of inflammation, and have been reported to regulate cellular functions in inflammatory responses toward numerous infectious agents, *in vivo* [19-22]. Some studies have reported that, in leishmaniasis, chemokine expression follows infection. Indeed, *in vitro* infection of murine macrophages with *L. major* led to a rapid and transient expression of MCP-1 and IL-8 [23, 24]. Human biopsy samples of patients suffering from localized cutaneous leishmaniasis contained important amount of MCP-1 in comparison to diffuse cutaneous leishmaniasis, where expression of MIP-1 α predominated [25]. A recent report has demonstrated the induction of some chemokine genes in BALB/c and SCID mice infected with *L. donovani* [26]. The results of this study showed a rapid hepatic accumulation of MCP-1, MIP-1 α and IP-10 genes that was T cell-independent. However, IP-10 expression persists until 7 days post-infection and seems to require T-cell activity. Nevertheless, *in vivo* studies of the pattern of chemokine expression during cutaneous leishmaniasis in comparison to visceral leishmaniasis have yet to be done. The fact that *Leishmania* infections could progress toward the development of a species-specific pathologies, led us to postulate that the early inflammatory events occurring at the site of inoculation may reflect and direct the type of species-specific pathogenesis that will develop at a later time. Thus, in the present study, we were interested to determine whether *Leishmania* could induce the production of chemokines

by macrophages, *in vitro* and more importantly *in vivo*. More specifically, we wanted to determine if the development of chronic skin inflammation and lesions could be associated with species-specific chemokine profile and other inflammatory events.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Isotopes were obtained from Mandel Scientific Company (Saint-Laurent, QC, Canada). Recombinant murine IFN γ (2×10^5 U/ml) was purchased from Gibco BRL (Burlington, ON, Canada). Six to eight-week old male BALB/c mice, 20-30 g body weight (bwt) were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). Lipopolysaccharide (LPS) (*E. coli*, serotype 0111:B4) was purchased from Sigma (St-Louis, MO). Endotoxin-free PBS was purchased from Gibco (Gibco BRL, Grand Island, NY).

Macrophage cell line. The B10R macrophage (M \emptyset) cell line was kindly donated by Dr. Danuta Radzioch (McGill University, Montréal, Québec) [27]. The cells were grown in DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), 5% L-glutamine (Gibco BRL, Grand Island, NY) and 5% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY). Cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO $_2$ atmosphere and transferred biweekly.

Parasite cultures. Promastigotes of *Leishmania donovani* 1S2D (Ld) and *Leishmania major* friedlin (Lm) strains were grown at room temperature and transferred weekly in SDM-79 culture medium (Gibco BRL, Grand Island, NY), as previously described [28, 29].

Air pouch and leukocyte migration. Air pouches were raised on the dorsum of BALB/c mice, as previously described [30]. Briefly, mice were anaesthetized using metofane, their backs were shaved and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, via a 0,22 μ m millipore filter, into the dorsum. Three days later, the air pouch was reinflated with 2 ml of sterile air. Seven days after formation of the air pouches, all stimulations

were done by injection of Lm and Ld stationary phase promastigotes (1×10^7 parasites resuspended in 1 ml of endotoxin-free PBS; Gibco BRL, Grand Island, NY), into the air pouches. Control mice were injected with PBS (negative control) and LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) (positive control). At various times after induction of inflammation (0, 3, 6, 12, 24 and 48 hr), 5-10 animals per experimental group were lethally anesthetized, and the pouch contents were collected by washing with a total of 5 ml of endotoxin-free PBS to collect leukocytes of the exudate. Recruited cells were counted directly with a hemacytometer. Differential cell counts were performed microscopically on Diff-Quick-stained cytospin preparation. Collected supernatants, recruited leukocytes, and dissected air pouch linings were kept at -20°C for further evaluation.

In vitro Leishmania-induced macrophage cytokine/chemokine generation. To determine whether *Leishmania* can induce the expression of M ϕ pro-inflammatory cytokines and chemokines, murine M ϕ (5×10^6) were infected over an 8 hr period with *Leishmania* spp. at a parasite to cell ratio of 20:1. In parallel, LPS (100 ng/ml) was used as a positive control. At different intervals (0, 2, 4, and 8 hr), supernatants were collected and cells were washed (3X) with PBS to eliminate un-ingested parasites. The total RNA from B10R M ϕ was isolated using TRIzol (Gibco BRL, Grand Island, NY) according to the manufacture's instructions.

Northern blot analysis. In certain experiments, *Leishmania*-induced cytokine gene expression was monitored by Northern blot analysis, as we previously described [31]. Briefly, 10 μg of total RNA were separated on a 1% agarose gel containing 18% formaldehyde by electrophoresis and transferred thereafter onto a Nytran Plus membrane (Mandel Scientific Company Ltd., Guelph, Ont.) by capillarity. Membranes were then incubated in the presence of ^{32}P -labelled murine cytokine cDNA probes (IL-1 β and TNF- α) for 20 hr. The level of mRNA expression was revealed on BIOMAX-MR films.

Hybridization of the membrane with a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe was used to confirm equal loading and integrity of RNA in each lane. All probes were kindly provided by Dr. Danuta Radzioch (McGill University, Montréal, QC, Canada).

RNase protection assay. Chemokine gene expression induced by *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo* was monitored by RNase protection assay (mCK-5 Riboquant kit; Pharmingen, Mississauga, ON) allowing the simultaneous determination of a large number of these proinflammatory molecules (i.e. Lymphotoxin, RANTES, eotaxin, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10, MCP-1, and TCA-3). Briefly, the commercial probe was labeled with ³²-P UTP for 1 hr at 37°C in presence of ribonucleotides GACU, DTT, 5X transcription buffer, RPA template set, Rnasin, and T7 polymerase. The probe was further treated with DNase (30 min/37°C) prior to phenol/chloroform extraction followed by a chloroform:isoamyl extraction. The resulting aqueous phase was precipitated by the addition of 4 M ammonium acetate and ice-cold 100% EtOH (30 min/-70°C). After centrifugation, the pellet was washed once with ice-cold 90% ethanol and air-dried for 10 min. The pellet was then solubilized in 50 μ l of hybridization buffer. Next, 10 μ g of total RNA was prepared. The samples were frozen for 15 min at -70°C then dried in a vacuum evaporator centrifuge for 20 min. The RNA was then solubilized in 8 μ l of hybridization buffer; the labeled-probe (3×10^5 cpm/ μ l) was added to each RNA samples and then incubated for 12 hr at 56°C. Finally the incubated samples were subjected to RNase treatment by adding 100 μ l of RNase cocktail to each tube, for 45 min at 30°C. Eighteen μ l of the proteinase K cocktail was mixed with RNase digests for 15 min at 37°C. A phenol/chloroform extraction was performed before RNA precipitation by addition of 4 M ammonium acetate and ice cold 100% EtOH for 30 min at -70°C. After a brief wash with ice cold 90% EtOH, the pellet was air dried, and finally resuspended in 1X loading buffer. The samples were heated for 3 min at 90°C and placed in an ice bath prior to their loading

onto a 5% acrylamide gel. The gel was dried and exposed to a BIOMAX-MR film at -70°C. A sample of the probe (1000-2000 cpm/lane) was diluted in loading buffer to serve as a size standard.

ELISA. Previously collected *in vitro* culture supernatant and *in vivo* air pouch exudate samples were centrifuged at 1200 rpm for 10 min to remove cells. ELISA was used to detect TNF- α and IL-1 β in the specific supernatants, and done as specified by the manufacturer (Endogen, Woburn, MA).

Statistical analysis. Statically significant differences between groups were performed were determined by analysis of variance (ANOVA) using SAS software (version 6.07, SAS Institute, Cary, NC) using the Fisher least significant difference test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Leishmania-induced macrophage in vitro chemokine gene expression. To determine whether *Leishmania* spp. could differentially induce chemokine gene expression, macrophages were stimulated with Lm or Ld and the levels of chemokine gene mRNA were analyzed. Our results revealed that stationary phase promastigotes of Lm and Ld can transiently induce expression of several chemokine genes (Figure 1). The RNase protection assays revealed that *Leishmania* parasites can induce MIP-1 β , MIP-1 α , MIP-2, and MCP-1 mRNA gene expression. Maximal chemokine gene expression was detected 2 hr post-stimulation and rapidly declined thereafter (Figure 1). However, expression of certain chemokine genes was not induced by *Leishmania* (*i.e.* RANTES, IP-10), whereas LPS, used as positive control, strongly induced many of the chemokine genes (*i.e.* RANTES, MIP-1 β , MIP-1 α , MIP-2, IP-10 and MCP-1). These data indicate that *Leishmania* spp. can selectively induce a subset of chemokine genes but a capacity to differentially induce them was not observed *in vitro*. IL-1 β and TNF- α mRNA expression and protein secretion were monitored in parallel (data not shown). As others and we previously reported [2-7], *Leishmania* parasites were good inducers of TNF- α mRNA and protein, whereas IL-1 β induction was not detected in response to either *Leishmania* species. Overall, these results concur with previous observations showing that *in vitro* macrophage Lm infection leads to chemokine gene expression (*i.e.* IL-8, MCP-1 and Gro- α) [24, 32].

Ability of Leishmania spp. to elicit leukocyte recruitment in vivo in an air pouch model. To evaluate whether *Leishmania* parasites can differentially elicit inflammatory cells accumulation, Lm and Ld promastigotes were inoculated into an air pouch formed on the back of BALB/c mice. Leukocyte recruitment reached its peak at 6 hr post-inoculation and then declined over a 48 hr period (Figure 2). Whereas inoculation of endotoxin-free

PBS did not induce leukocyte accumulation, Lm led to an important transient accumulation of leukocytes (31-fold increase over PBS control). Similarly, LPS inoculation led to an important influx of leukocytes (20-fold increase over PBS control) into the air pouches, but of less importance compared to that in Lm infection, at 6 hr following inoculation. Of interest, Ld proved to be a poor inducer of leukocytes accumulation (7-fold increase over PBS control) in comparison to Lm promastigotes.

To determine the type of leukocytes recruited, cell exudates harvested from pouches were stained and differential counts were performed. Neutrophils, monocytes, eosinophils, and lymphocytes were counted at different time points following parasite inoculation. LPS was a potent inducer of cell accumulation in the pouch, 6 hr post-injection. As shown in Figure 3, upon stimulation with LPS, a great number of neutrophils (Figure 3A), and a smaller number of macrophages (figure 3B), eosinophils (figure 3C) and lymphocytes (Figure 3D) were recruited. Thus, the addition of LPS in air pouch led to the recruitment of a major population of neutrophils, at 87% (figure 4A), which remained elevated until 48 hr. Other cell populations (macrophages, eosinophils, lymphocytes) remained lower but seemed to slightly increase with time (figure 4 B, C, D). However, the injection of *Leishmania* led to the recruitment of mixed cell populations, comprising approximately 50% neutrophils, 30% monocytes/macrophages, and 20% eosinophils with few lymphocytes (Fig. 4 A, B, C, D). As shown in Figure 3, Lm was the most potent recruiter of all cell types. Indeed, Lm induced the accumulation of the highest number of neutrophils (figure 3A), macrophages (figure 3B), eosinophils (figure 3C) and lymphocytes (figure 3D) in comparison to Ld injection, at 6 hr post-infection. Analysis of cell populations recruited in response to both species of *Leishmania* demonstrated that neutrophils make up the main population (Figure 4A) in the early period following injection but that their proportion declined in a time-dependent manner. In addition, the important population of eosinophils, noted at 6 hr post-infection, also declined thereafter

(Figure 4C). On the contrary, the already elevated numbers of macrophages (Figure 4B) and to a lesser extent, lymphocytes (figure 4D) increased with time. In fact, the highest proportion of macrophage population reached maximal level at 24 hr post-infection and remained elevated up to 48 hr (Figure 4B). Thus, although stimulation by both LPS and Lm are recognized to result in the onset inflammation, Lm induced a more intense accumulation of leukocytes in comparison to LPS. Moreover, Lm recruited a greater number of macrophages and eosinophils than LPS. Neutrophil recruitment was mostly induced by LPS (Figure 5 panels LPS and Lm). These observations can be seen in Figure 5 where the LPS panel showed an important number of cells, mainly by neutrophils. The Lm panel illustrates the greater recruitment of leukocytes (neutrophils, macrophages, and eosinophils) compared to the smaller number of cells observed in the Ld panel. The insets illustrate that macrophages, recruited in response to both species of the parasite, were able to phagocyte promastigotes. We observed parasites in the phagocytic vacuoles located in the cytoplasm of macrophages taken from the air pouch at 6 hr post-injection. These *in vivo* experiments clearly established that the Lm parasite can differentially modulate cell recruitment during early inflammatory responses in comparison to Ld.

Accumulation of TNF- α and IL-1 β proteins in the air pouch following Leishmania inoculation. The pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β have been recognized to play a major role in inflammatory events leading to cellular recruitment in response to various agents. To examine whether differential *Leishmania*-induced cell recruitment could be paralleled by the accumulation of these proinflammatory cytokines in the air pouches, we evaluated the extracellular production of TNF- α and IL-1 β in the exudate supernatants by ELISA. As reported in Figure 6, supernatants collected 6 hr post-inoculation from air pouches subjected to Lm and Ld infection, revealed that Lm was the most potent inducer of TNF- α (5-fold more) and IL-1 β (21-fold more) in comparison to Ld. These observations are different from *in vitro* experiments showing that IL-1 β was not

inducible by *Leishmania spp.*, although a similar induction of TNF- α by Ld and Lm has been reported by others [2-7].

Effect of Leishmania major and Leishmania donovani on chemokine gene expression in the pouch tissue and exudate cells. To evaluate the expression of CXC and CC chemokine mRNAs in response to *Leishmania* infection, RNA from exudate cells and surrounding pouch lining tissue collected 6 hr post-*Leishmania* inoculation were extracted and subjected to an RNase protection assay, as described previously in the material and methods. *Leishmania* injection induced gene expression of many CXC and CC chemokines in the exudate cells as well as in the lining tissue. The air pouch however, was affected in a different manner. As shown in Figure 7, expression of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 in the exudate cells was increased following *Leishmania* (either Lm or Ld) injection. IP-10 mRNA expression was only up-regulated in pouch exudate whereas expression of eotaxin appeared to be restricted to the pouch lining. There was no induction of lymphotactin gene expression at either site, nor was there a difference in TCA-3 and MIP-2 expression in exudate cells following infection by either species. A different pattern of induction of other chemokine gene expression was observed depending the strain of *Leishmania*. Indeed, as shown in Figure 7, injection of Lm led to a greater up-regulation of RANTES, MIP-1 α/β , IP-10, and MCP-1 in exudate cells in comparison to Ld infection. The expression of MIP-1 α/β and MCP-1 was slightly amplified in response to Lm as compared to Ld whereas the greatest difference was observed for RANTES and IP-10. On the contrary, there was a greater induction of eotaxin, MIP-1 α/β , and MIP-2 by Ld in the pouch lining tissue in comparison to Lm infection (Figure 7). However, MCP-1 and TCA-3 expression was similar in response to each species. of *Leishmania*. Thus, *Leishmania spp.* were able to induce a broad range of chemokine gene expression in our air pouch system but their capacities seemed to differ in the pouch exudate and pouch lining.

Effect of Leishmania major and Leishmania donovani on specific CC chemokine receptor gene expression in air pouch exudate cells. Following our observations of the expression of specific chemokine genes, we became interested in evaluating whether *Leishmania* modulated CC chemokine receptor gene expression differently than Ld. Total RNA was extracted from the exudate cells of air pouches 6 hr following injection of Lm and Ld. The RNA was then subjected to Riboquant analysis. Injection of *Leishmania* induced CCR1, CCR3, CCR5, and CCR2 gene expression (see Figure 8). Expression of CCR3, CCR5, and CCR2 was induced to a greater magnitude by Lm compared to Ld. There was approximately 40% more induction of these mRNAs following injection of Lm, as shown by densitometric analysis (Figure 8). This observation is of importance and suggests that the greater chemokine receptor expression induced by Lm infection could explain in part why leukocytes were recruited in greater number to the inoculation sites by Lm than by Ld.

DISCUSSION

Leukocytes play an important role in host defenses and their recruitment into the infected tissue might be a crucial event in *Leishmania*-induced inflammatory reactions. This is due to a massive infiltration of leukocytes in skin lesions that occurs in cutaneous leishmaniasis. Furthermore, macrophages are implicated in many ways in the development of this type of infection; for example, they are antigen-presenting cells, used as host cells and replication sites by parasites, and also act as mediators of the host response by the secretion of many proinflammatory cytokines, chemokines and others inflammatory factors. Thus, we have evaluated the regulation of diverse inflammatory events during the early phase of two different *Leishmania* infections to establish whether the development of cutaneous and visceral pathologies could be associated with the modulation of specific proinflammatory mediators.

The results of the *in vitro* study showed that exposure of murine macrophages to both strains of *Leishmania* induces the expression of MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1 but that neither Lm nor Ld induced detectable expression of lymphotactin, RANTES, eotaxin, IP-10, or TCA-3. Infection by either species led to a similar pattern of chemokine expression, but less potent than that of LPS, an agonist recognized for its action on the induction of chemokines in cells [33, 34]. The rapid and transient induction of these chemokines by *Leishmania* was in agreement with the results presented by Racoosin and Beverley [24] who showed a rapid and transitory expression of MCP-1 and KC (gro- α) in murine bone marrow-derived macrophages infected with Lm. Although we demonstrated here the induction of MIP-1 α expression by both strains of *Leishmania*; no increases in the level of expression of MIP-1 α were reported in that previous report [24] that macrophages infected with Lm have not an increase in their level of MIP-1 α expression. It is unclear if this difference in MIP-1 α expression depends on the type or species of host

macrophages. Taken together, these results indicate for the first time that macrophages exposed to both species of *Leishmania* can similarly induce a specific range of chemokines, in comparison to others studies restricted to the evaluation of JE/MCP-1, KC/Gro- α , and IL-8 chemokine induction in murine macrophages in response to Lm solely (23, 24). Therefore, the results obtained in our *in vitro* system suggest that Lm and Ld can differentially modulate proinflammatory molecules, which would further activate cellular and immunological mechanisms that direct development of cutaneous or visceral pathogenesis. For this reason, we thought that, whereas *Leishmania* parasites are known for their tropism toward cells of the monocyte/macrophage lineage, inoculation of the promastigotes, through the bloodsucking bite of the sandfly, into the dermis of the host must lead to the activation of several types of cells that reside in the dermis (*i.e.* fibroblasts and Langerhan's cells) and may lead to secretion and modulation of a varieties of proinflammatory molecules.

Thus, we performed *in vivo* studies using a murine air pouch system to further evaluate the implication of such chemokines in the development of these two different type of leishmaniasis. This technique is closer to the *in vivo* situation than *in vitro* studies, which do not include cell–cell interactions and are missing certain cellular mediators. It enabled us to simulate the inoculation site of the sandfly in a closed environment, provided a suitable space for the induction of inflammation by a variety of agents, and enabled a subsequent analysis of the inflammatory parameters and mediators [35]. Thus, we investigated the induction of proinflammatory cytokine and specific chemokine gene expression by both strains of *Leishmania* at this extravascular site, *in vivo*.

Injection of Lm and Ld into air pouches caused a rapid and transient increase in exudate cellular content during the first 48 hr. The kinetic of leukocyte accumulation

confirmed and extended previous data obtained from other studies using different types of stimulations [36-38], with respect to a rapid and transient neutrophil and eosinophil response with a maximal increase in the early phase of cutaneous leishmaniasis, and an increasing macrophage response which predominated thereafter. Our results are consistent with other studies [36-38] that reported an intense neutrophil and a variable eosinophil infiltration into the dermis of lesion sites during the acute phase of Lm and *L. amazonensis* infection. The morphological aspects of the parasite once inside the granulocytes suggested that intracellular killing may have occurred. Thus, neutrophils and eosinophils may possess leishmaniacidal activity that restrain the parasite progression at the initial step of the infection. The monocyte/macrophage population which are recognized to regulate the infection by its ability to potentially kill the parasite after its phagocytosis if it can avoid *Leishmania*-mediated functional inhibition, mainly served as a reservoir for parasite replication. It is interesting to note that Lm was the most potent recruiter of leukocytes in air pouch, suggesting that this important leukocyte accumulation could help reduce parasitic load and restrict spreading of *Leishmania* infection although permitting the development of a characteristic skin lesion. On the other hand, the low level of leukocyte recruitment following Ld infection did not strongly induce leukocyte recruitment in the pouch could indicate that this parasite may have developed strategies that minimize early inflammatory response permitting unrestrained progression within the host.

In fact, lipophosphoglycan (LPG), the most abundant glycolipid on the cell surface of *Leishmania* promastigote [39], possesses potent cell inhibitory activity [40]. LPG participates in binding to the macrophage and phagocytosis and protects the parasite from lysis by the complement cascade, by reactive oxygen intermediates, and hydrolytic enzymes of the macrophage phagolysosome [41]. However, structural analysis of LPG from several species of *Leishmania* showed total conservation of the lipid anchor,

important conservation of the phosphosaccharide core, and variability of sugar composition and sequence in the repeating phosphorylated saccharide units and the cap structure [40]. Lo et al. [42] have reported that LPG of Ld blocked LPS-mediated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) on endothelial cells, consequently altered the transendothelial migration of monocytes. However, in our hand, LPG injection (from both strains of *Leishmania*; kindly provided by S. Turco, University of Kentucky, USA) *per se* did induced leukocyte recruitment (data not shown). Nonetheless, the two LPG molecules and the total number of leukocytes reached levels comparable to Ld injection (data not shown) in the number of recruited cells demonstrated no significant difference. Therefore, whereas Ld LPG has been reported to affect important molecules involved in transendothelial migration *in vitro*, we excluded involvement of *Leishmania* LPG molecule in the triggering of cellular recruitment in our air pouch system.

At infection sites, neutrophils and mononuclear leukocytes respond to various agents. In keeping with their central role as regulators of the proinflammatory response, TNF- α and IL-1 β were released from activated neutrophils and monocytes/macrophages to directly stimulate the expression of genes in these cells [8]. In the present study, we show that injection of *Leishmania* leads to an early production of these proinflammatory cytokines; however, Lm infection induces a greater release in the pouch exudate. The smaller amount of IL-1 β measured in pouch of mice infected with Ld is consistent with the results reported by Hatzigeorgiou and colleagues [7]. Another study [43] has demonstrated a decreased production of both cytokines *in vitro* by mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis during the acute disease. A study showing an increase in IL-1 β production in murine peritoneal macrophages infected with Lm [4] supports our observation that Lm was a better inducer of both cytokines in pouch exudates. Since the pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) lack chemotactic properties, they can not directly cause leukocyte infiltration after *Leishmania* infection. On the other hand, some

studies [44, 45] have previously reported their implication in the induction of the expression of several chemokine genes. A diversified cellular population (neutrophils, monocytes/macrophages, and eosinophils) was recruited into the pouch exudate in response to the parasite *Leishmania*. This cellular accumulation may be associated with the pattern of chemokine gene expression. The results of the present study demonstrated that the cells of the pouch exudate recruited in response to *Leishmania* infection express RANTES (Lm only), MIP-1 β/α , MIP-2, IP-10, and MCP-1. In addition, evaluation of the expression of these chemokine genes in the cells composing air pouch lining tissue demonstrated an induction of MIP-1 β/α , MIP-2, MCP-1, and TCA-3 genes in response to both parasites. We also observed the expression of eotaxin. No expression of RANTES and IP-10 was detected in the pouch lining tissue from *Leishmania*-inoculated mice. These results regarding the chemokine profiles detected in mice pouches might explain, at least in part, the mixed population recruited in response to *Leishmania*. Indeed, the chemokines induced in response to *Leishmania* are known to recruit mainly monocytes/macrophages (RANTES, MIP-1 β/α , IP-10, and MCP-1), neutrophils (MIP-2 and TCA-3) and eosinophils (RANTES, eotaxin and MIP-1 α). Nevertheless, the strongest expression of specific chemokines (RANTES, and to a lesser extent IP-10 and MIP-1 β/α) induced by Lm in pouch exudate compared to Ld could play an important role in the greater leukocyte accumulation in pouch exudate, resulting in the amplification of inflammation at extravascular sites. The major difference in the pattern of chemokine expression between the two *Leishmania* species in exudate and pouch lining tissue was observed for RANTES the expression of which was 6- fold higher in Lm- than Ld- or PBS-inoculated animals. Studies have reported a potential importance for RANTES in cutaneous inflammation. Both TNF- α and IL-1 β are known to stimulate dermal fibroblasts to express RANTES [46]. Moreover, RANTES seems to play a key role in delayed type hypersensitivity reactions where cells of the monocyte/macrophage lineage are mainly implicated and represent the source contribution to RANTES production [47].

The upregulation of RANTES expression by Lm may be implicated in the containment of the infection at skin level as a study have demonstrated that human macrophages treated with purified recombinant human RANTES and further infected with *Trypanosoma cruzi*, showed enhanced uptake and intracellular destruction of trypomastigotes [48]. Such observations led us to determine whether the upregulation of RANTES by Lm could be correlated by a precise modulation of chemokine receptor expression. Our study showed that *Leishmania* induces the expression of CCR1, CCR3, CCR5 and CCR2 whereas the expression of CCR4 is undetectable. RANTES and MIP-1 α are known ligands for CCR1, whereas CCR3, a specific eosinophil receptor, responds to RANTES and eotaxin. CCR5 is stimulated by RANTES and MIP-1 α/β and finally, CCR2 binds to MCP-1. It is interesting to note that Ld is only able to induce to a lesser extent these chemokine receptors, especially RANTES receptor, correlating nicely with its reduced capacity to induce leukocyte recruitment. As it has been [42] demonstrated that LPG of Ld altered the migration of inflammatory cells by affecting the expression of specific adhesion molecules, Ld must avoid chemokine attractive actions by altering the expression of their specific receptors or selectively do not conduct to RANTES induction. Additionally, since Lm seems to be a more powerful proinflammatory cytokine inducer than Ld, it is possible that chemokine receptor expression is modulated by these cytokines, thus permitting to circulating leukocytes to further migrate toward Lm inoculation site.

Taken together, these results clearly demonstrated that Lm can act on specific inflammatory mediators (proinflammatory cytokines, chemokines and their receptors) leading to the recruitment of an important number of competent cells that might be responsible for its restriction at inoculation site and implicated in the development of its specific and characteristic cutaneous lesion. On the other hand, Ld can minimally interfere with these mediators, resulting in reduced leukocyte accumulation that could favor Ld progression toward its target organs. We are presently investigating the implication of other inflammatory agents in our system.

REFERENCES

- 1- Ashford, R.W., P. Desjeux, P. De Raadt. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1992; 8:104-05.
- 2- Reiner, N.E. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis: evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin-1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol* 1987; 138:1919-25.
- 3- Olivier, M., C.E. Tanner. Effect of cyclosporin A in murine leishmaniasis. *Trop Med Parasit* 1989; 40:32-8.
- 4- Cillari, E., M. Dieli, E. Maltese, S. Milano, A. Salerno, F.Y. Liew. Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection in vitro and its inhibition by IFN- γ . *J Immunol* 1989; 143:2001-5.
- 5- Descoteaux, A., G. Matlashewski. *c-fos* and TNF gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol* 1989; 9:5223-7.
- 6- Bernier, R., S.J. Turco, M. Olivier, M. Tremblay. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol* 1995; 69:7282-85.
- 7- Hatzigeorgiou, D.E., J. Geng, B. Zhu, Y. Zhang, K. Liu, W.N. Rom, M.J. Fenton, S.J. Turco, J.L. Ho. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin-1 β gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14708-13.

- 8- Matsushima, K., K. Morishita, T. Yoshimura et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MND CF) and the induction of MND CF mRNA by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **1993**; 167:1883-93.
- 9- Baggiolini, M., B. Dewald, B. Moser. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* **1994**; 55:97-179.
- 10- Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **1994**; 266:1395-9.
- 11- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, et al. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX(3)C motif. *Nature* **1997**; 385:640-4.
- 12- Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou et al. Neutrotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* **1997**; 387:611-7.
- 13- Miller, M.D., M.S. Krangel. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *CRC Crit Rev Immunol* **1992**; 12:17-46.
- 14- Kennedy, J., G.S. Kelner, S. Kleyensteuber et al. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* **1995**; 155:203-9.
- 15- Nakamura, H., K. Yoshimura, H.A. Jaffe, R.G. Chrystal. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* **1991**; 266:19611-7.

- 16- Koyama, S., E. Sato, H. Nomura, K. Kubo, S. Nagai, T. Izumi. Type II pneumocytes release chemoattractant activity for monocytes constitutively. *Am J Physiol* **1997**; 272:L830-37.
- 17- Sica, A., J.M. Wang, F. Colotta. et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by Il-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* **1990**; 144:3034-8.
- 18- Standiford, T.J., S.L. Kunkel, S.H. Phan, B.J. Rollins, R.M. Strieter. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem* **1991**; 266:9912-8.
- 19- Burgmann, H., U. Hollenstein, C. Wenisch, F. Thalhammer, S. Looreesuwan, W. Graninger. Serum concentrations of MIP-1 α and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum*. *Clin Immunolpathol* **1995**; 76:33-6.
- 20- Doyle, H.A., J.W. Murphy. MIP-1 α contributes to the anticryptococcal delayed-type hypersensitivity reaction and production against *Cryptococcus neoformans*. *J Leukoc Biol* **1997**; 61:147-55.
- 21- Rasmussen, S.J., L. Eckmann, A. J. Quayle, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in *Chlamydia* pathogenesis. *J Clin Invest* **1997**; 99:77-87.
- 22- Kasahara, K., T. Tobe, M. Tomita, et al. Selective expression of monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in human blood monocytes by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **1994**; 170:1238-47.

- 23- Carrera, I., R.T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn, D.L. Sacks. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin-12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 1996; 183:515-26.
- 24- Racoosin, E.L., S.M. Beverley. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 1997; 85:283-95.
- 25- Ritter, U., H. Moll, T. Laskay, E.-B. Bröcker, O. Velazco, I. Becker, R. Gullitzer. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous american leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996; 173:699-709.
- 26- Cotterell, S.E.J., C.R. Engwerda, P.M. Kaye. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol* 1999; 29:203-14.
- 27- Radzioch, D., T. Hudson, M. Boulé, L. Barrera, J.W. Urbance, L. Varesio, E. Skamini. B10R bone marrow macrophages from B10A. Bcg^r congenic strain of mice derived cloned macrophage line designated B10R. *J Leukoc Biol* 1991; 50:263-72.
- 28- Olivier, M., C.E. Tanner. Sensibility of macrophage population to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1987; 55:467-71.
- 29- White, T.C., F.F. Fase-Fowler, H. an Luenen, J. Calafat, P. Borst. The H circles of *Leishmania tarentolae* are a unique amplifiable system of oligomeric DNAs associated with drug resistance. *J Biol Chem* 1988; 263:16977-83.

- 30- Edwards, J.C.W., A.D. Sedgwick, D.A. Willoughby. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous infection of air: an *in vivo* tissue culture system. *J Pathol* **1981**; 143:147.
- 31- Olivier, M., B.-J. Romero-Gallo, C. Matte, J. Blanchette, B. Posner, M.J. Tremblay, R. Faure. Modulation of interferon- γ -induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. *J Biol Chem* **1998**; 273:13944-9.
- 32- Badolato, R., D.L. Sacks, D. Savoia, T. Musso. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp Parasitol* **1996**; 82:21-6.
- 33- Kasama, T., R.M. Strieter, T.J. Standiford, M.D. Burdick, S.L. Kunkel. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein-1. *J Exp Med* **1993**; 178:63-72.
- 34- Kasama, T., R.M. Strieter, N.W. Lukacs, M.D. Burdick, S.L. Kunkel. Regulation of neutrophil-derived expression of IL-10. *J Immunol* **1994**; 152:3559-69.
- 35- Yoshima, S., W.I. Cromartie, J.H. Shwab. Inflammation induced by bacterial cell wall fragments in the rat air pouch: comparison of rat strains and measurement of arachidonic acid metabolites. *Am J Pathol* **1985**; 121:327-36.
- 36- Pompeu, M.L., L.A. Freitas, M.L.V. Santos, M. Kowri, M. Barral-Netto. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Tropica* **1991**; 48:185-93.

- 37- Beil, W.J., G. Mlinardus-Hager, D.-Ch., Neugbauer, C. Sorg. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol* 1992; 52:135-42.
- 38- Lima, G.M.A.C., A.L. Vallochi, V.R. Silva, E.M.A.F. Bevilacqua, M.M.F. Kiffer, I.A. Abrahamson. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immuno Lett* 1998; 64:145-51.
- 39- Tolson, D.L., S.J. Turco, T.W. Pearson. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1990; 58:3500-7.
- 40- Turco, S.J., A. Descoteaux. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46:65-94.
- 41- Mc Neely, T.B., S. Turco. Requirements of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 1990; 144:2745-50.
- 42- Lo, S.K., L. Bovis, R. Matura et al. *Leishmania* LPG reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junction protein and chemoattractants. *J Immunol* 1998; 160:1857-65.
- 43- Ho, J.L., R. Badaro, A. Schwartz et al. Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *J Infect Dis* 1992; 165:1094-1102.

- 44- Matsushima, K., J.J. Oppenheim. Interleukin-8 and MCAF: Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* **1989**; 1:2-13.
- 45- Ohmori, Y., L. Wyner, S. Narumi, D. Armstrong, M. Stoler, T.A. Hamilton. 1993. Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines *in vivo*. *Am J Pathol* **1993**; 142:861-70.
- 46- Kuepper, M., J. Bartels, R. Kulke, E. Christophers, J.-M. Schröder. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 induce RANTES mRNA expression in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **1994**; 103:419.
- 47- Devergne, O., A. Marfaing-Koka, T.T. Schall et al. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med* **1994**; 179:1689-94.
- 48- Lima, M.F., Y. Zhang, F. Villalta. β -chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell Mol Biol* **1997**; 43:1067-76.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Kinetic patterns of chemokine gene expression in B10R murine macrophages in response to *Leishmania* infection *in vitro*. Cells were stimulated with LPS (100 ng/ml), Lm or Ld (20:1 parasites to cell ratio) for increasing periods of times. The mRNA expressions were monitored by Riboquant analysis. To ensure equal loading of RNA in each lane, the housekeeping gene GAPDH was also analyzed. Results are from one out of three experiments performed in a similar manner.

Figure 2: Number of leukocytes accumulating in the pouch exudate in response to *Leishmania spp.* Air pouches were raised on the backs of 6-8 week old male BALB/c mice. One ml of endotoxin-free PBS, LPS (20 µg in 1 ml), Lm or Ld (10^7 parasites in 1 ml) was injected into the pouches and the exudate was collected at different time points following injection. The total number of leukocytes was enumerated using a hemacytometer. The results represent mean \pm SD from at least four mice.

Figure 3: Number of neutrophils (A), monocytes/macrophages (B), eosinophils (C) and lymphocytes (D) accumulating in the pouch exudate in response to LPS, *Leishmania major* (Lm) or *Leishmania donovani* (Ld). Stimulation were performed as described in Figure 2. The exudate cells were placed onto microscope slide using a cytopspin, stained using Diff-Quik solution, and the number/percentage of neutrophils, monocytes/macrophages, eosinophils and lymphocytes per 100 cells was determined. The results represent mean \pm SD from at least four mice.

Figure 4: Percentage of neutrophils (A), monocytes/macrophages (B), eosinophils (C) and lymphocytes (D) recruited in the pouch exudate in response to LPS, *Leishmania major* (Lm) or *Leishmania donovani* (Ld). Stimulation and analysis were performed as described in Figure 2-3. The results represent the mean \pm SD from at least four mice.

Figure 5: Photographs reflecting the leukocyte population accumulating in the pouch exudate in response to PBS (negative control), LPS (positive control), *Leishmania major* (Lm) or *Leishmania donovani* (Ld). Exudate cells collected from air pouches, 6 hr post-stimulation, were cytopinned and Diff-Quick-stained. Photos have been taken at 1000X magnification.

Figure 6: Production of TNF- α and IL-1 β cytokines in air pouch exudates in response to *Leishmania* infections. Animals have been injected into their air pouches as described in previous figures. Exudates were collected, centrifuged and resulting supernatants subjected to ELISA as described in Materials and Methods. Values are the mean \pm SEM of 4 animals.

Figure 7: Patterns of chemokine gene expression in pouch exudate and in pouch tissue induced following *Leishmania* parasites inoculation. Animals were injected into the pouches as described in previous figures. The exudate cells (EC) as well as air pouch lining tissue (AP) were collected after 6 hr injection. The mRNA expressions were monitored by Riboquant analysis. Densitometric quantification of each chemokine mRNA was normalized to GAPDH. The results are representative of four independent experiments.

Figure 8: Patterns of C-C chemokine receptor (CCR) gene expression by leukocytes recruited in response to *Leishmania* infections. Exudate cells (EC) were collected 6 hr post-injection. CCR mRNA genes expression was monitored by Riboquant analysis. Graphs represent densitometry of bands from CC chemokine receptor mRNA normalized to GAPDH signal. The results are representative of two independent experiments.

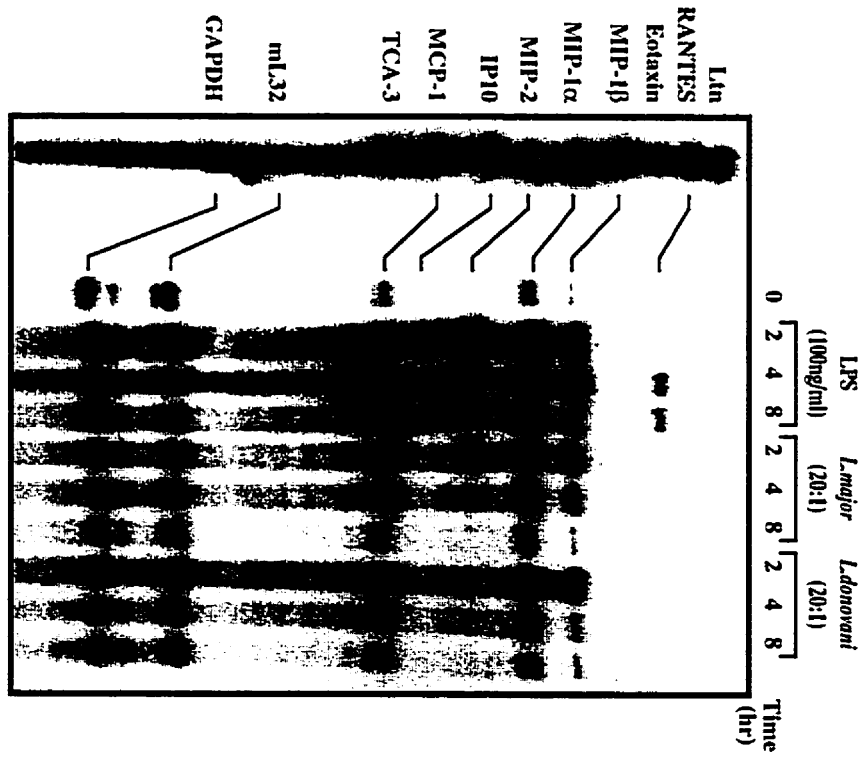
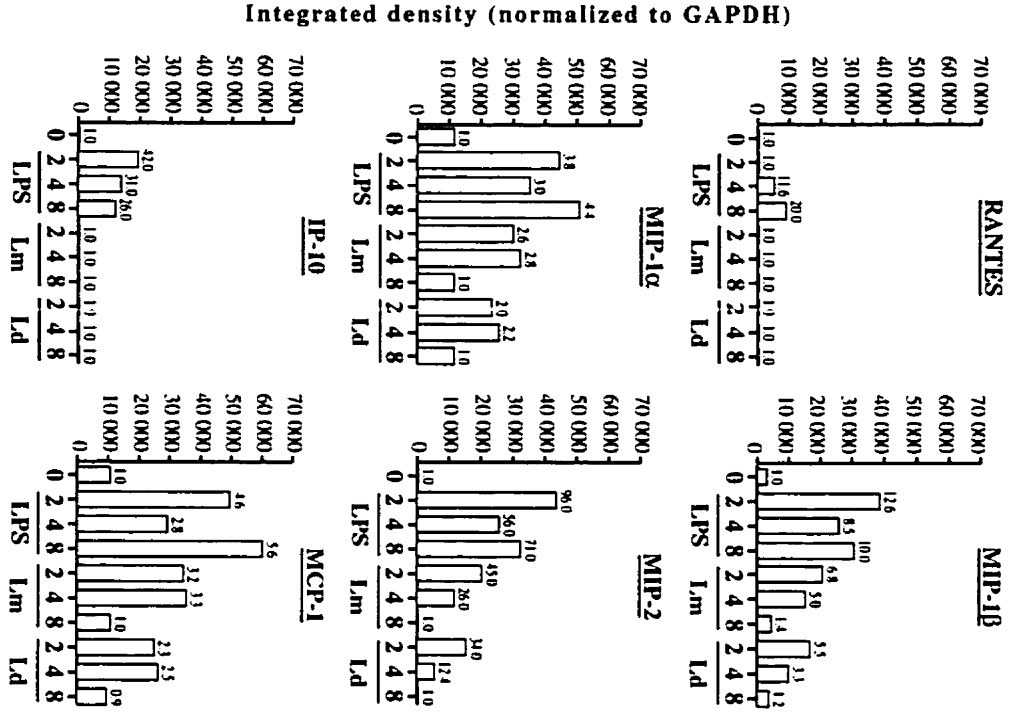


Figure 1

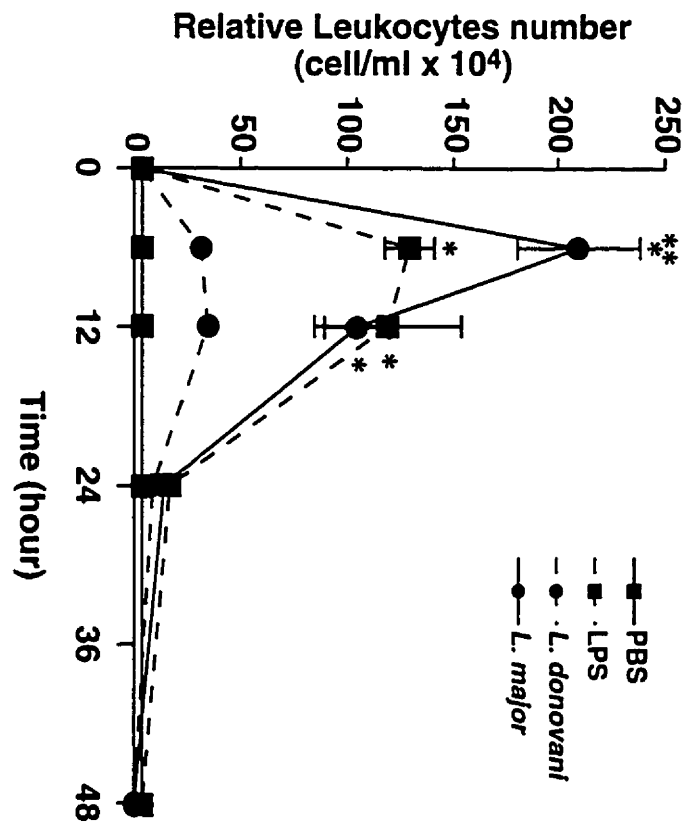


Figure 2

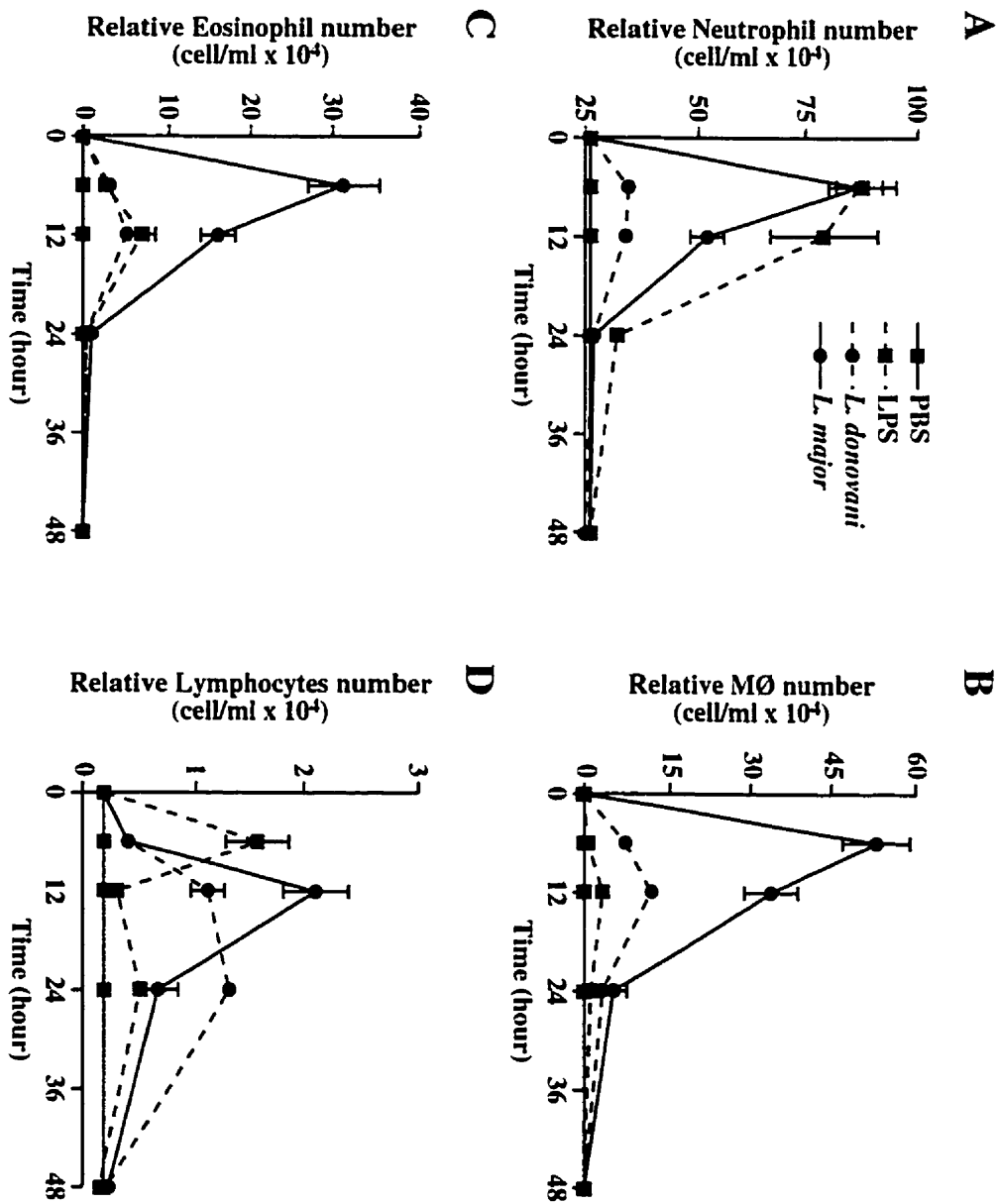


Figure 3

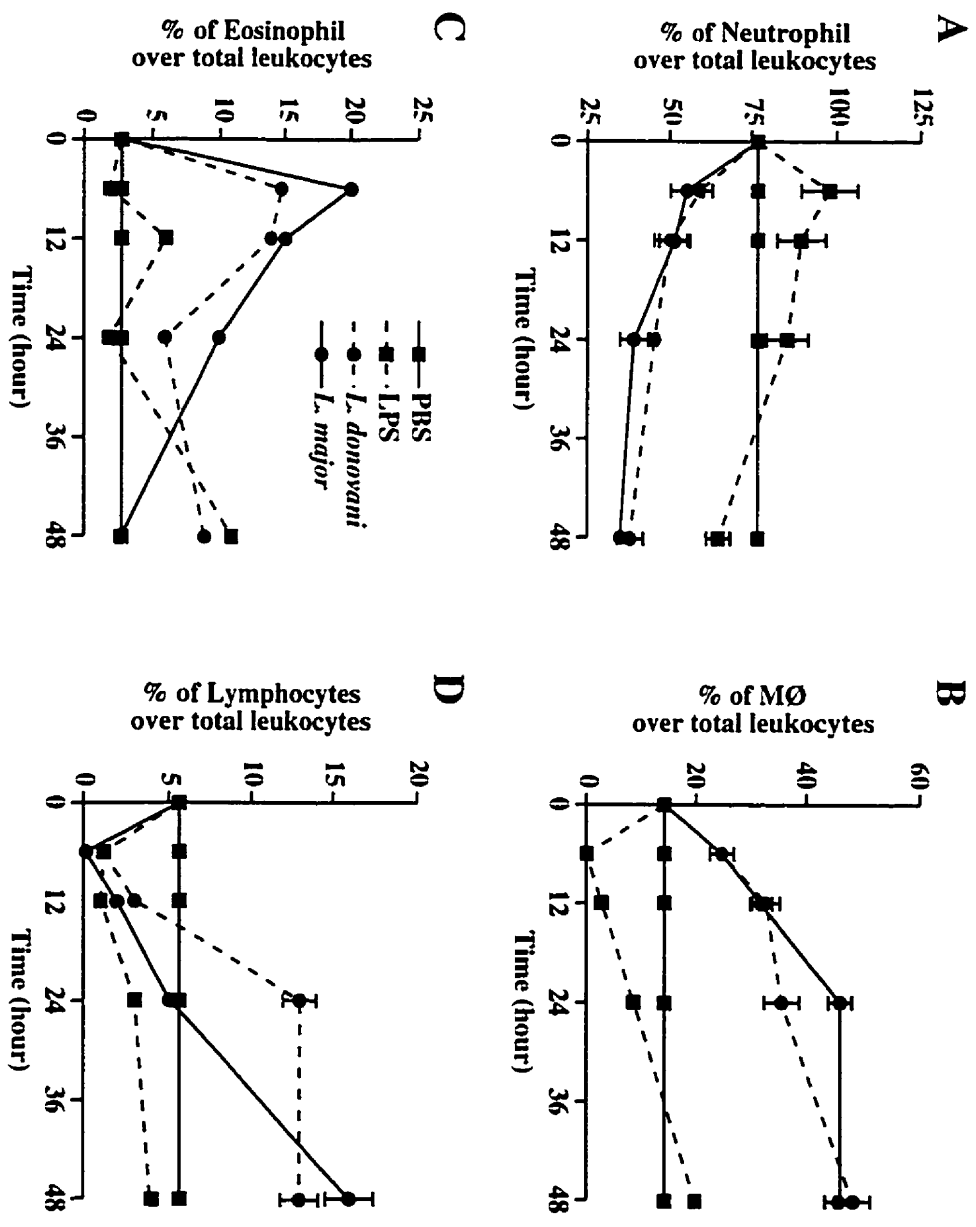
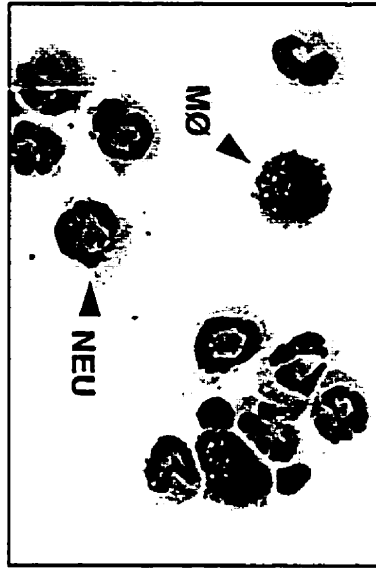


Figure 4

PBS



LPS



L. major



L. donovani

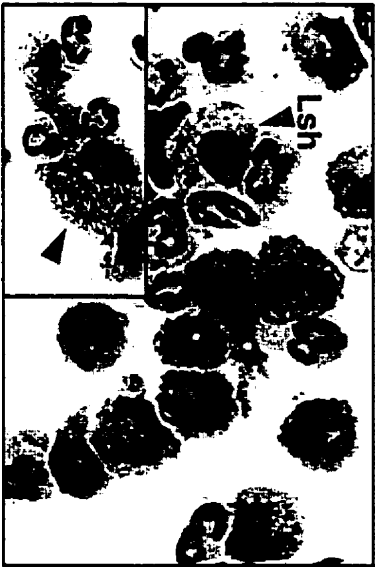


Figure 5

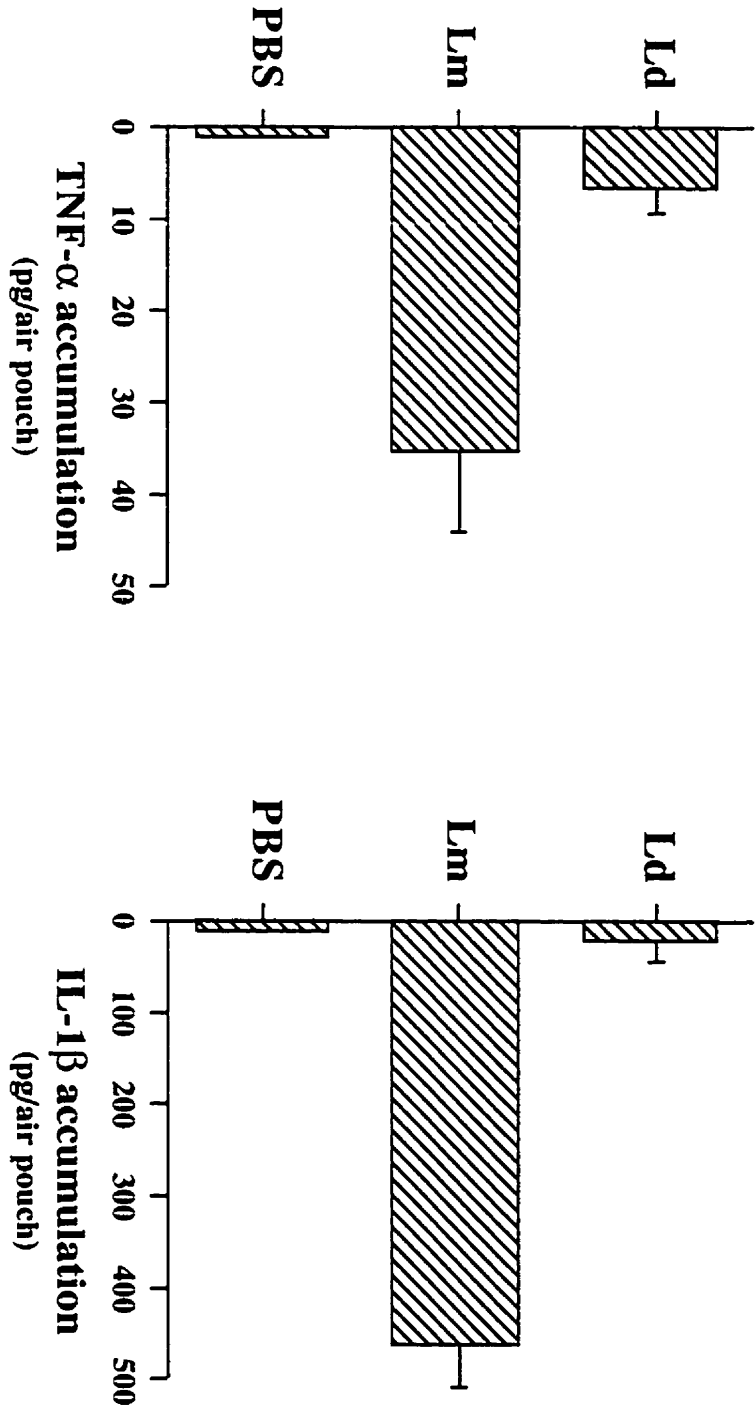


Figure 6

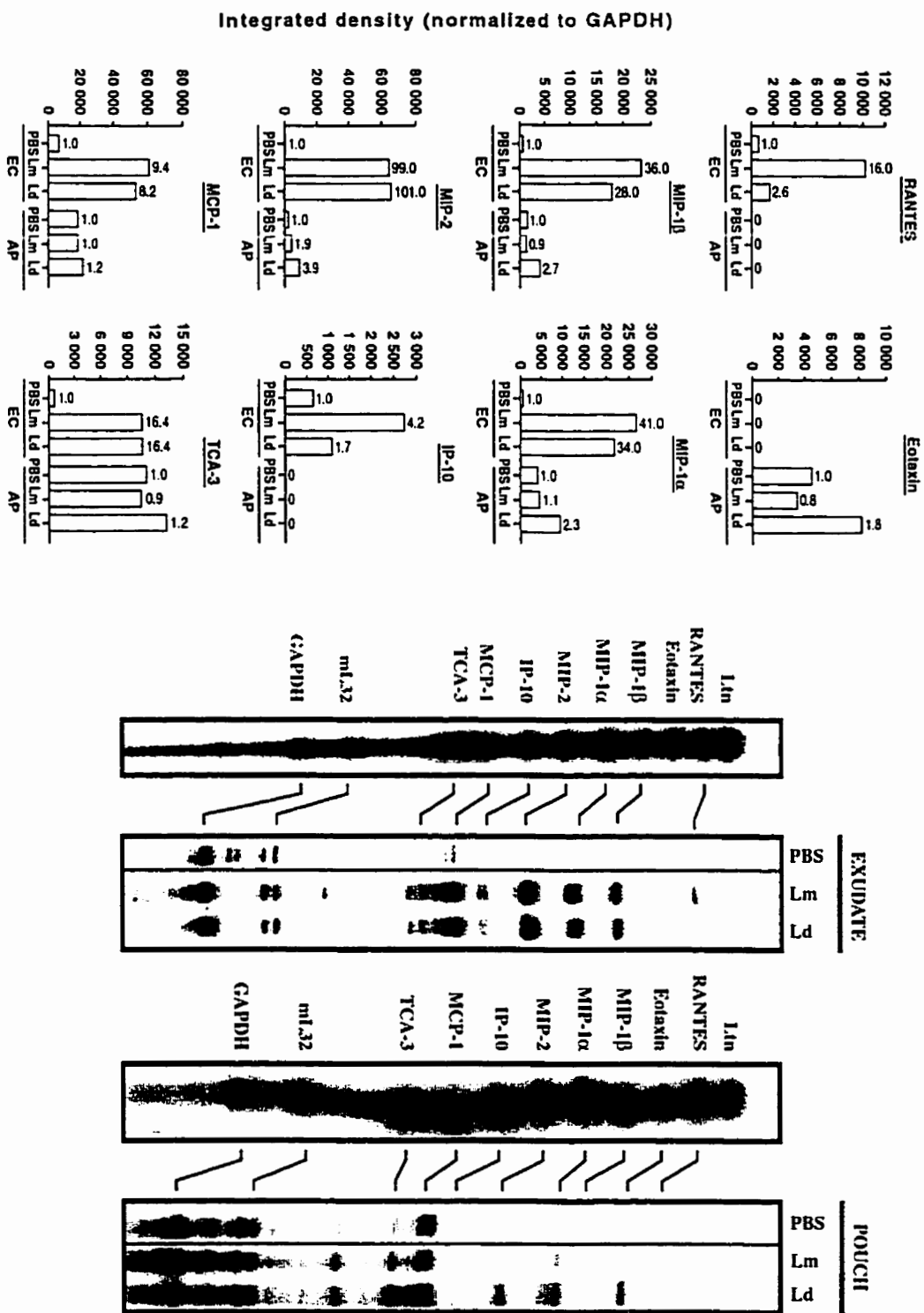


Figure 7

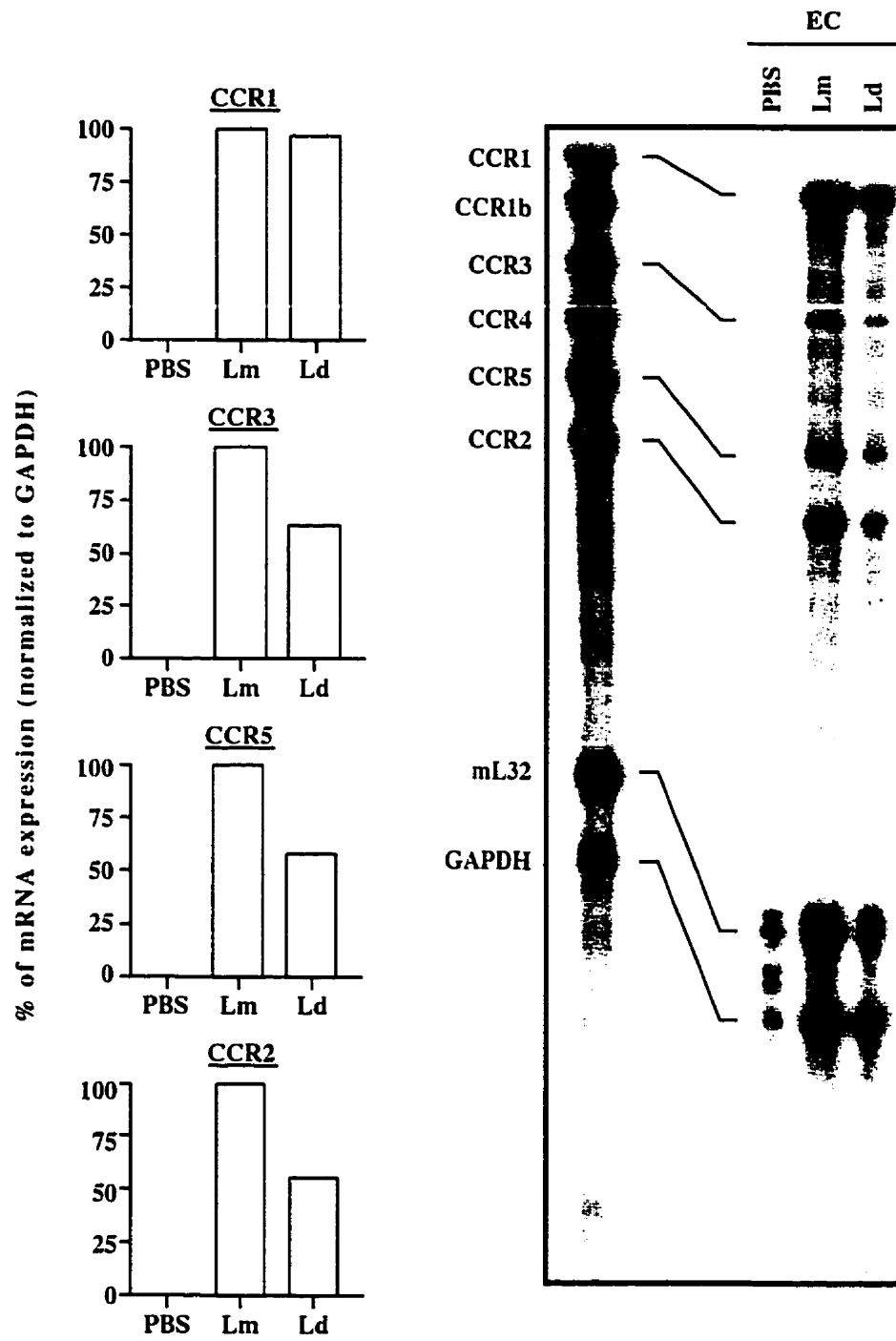


Figure 8

CHAPITRE 3

LA PROTECTION MÉDIÉE PAR LES PÉROXOVANADIUMS CONTRE LE *LEISHMANIA* : LE RÔLE DE LA MODULATION DU MONOXYDE D'AZOTE

3.1 RÉSUMÉ

Un effort considérable a été entrepris afin de mieux discerner les mécanismes de signalisation impliqués dans l'infection à *Leishmania*. Nous avons démontré récemment que l'inhibiteur de protéines tyrosines phosphatases (PTPs), le bisperoxy(1,10-phenanthroline)oxo-vanadate (Vi) (bpV(phen)), a la capacité de diminuer de façon marquée la progression des leishmanioses murines cutanées et viscérales (22). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'identification des mécanismes responsables de cet effet protecteur *in vivo*. Nous démontrons que les deux composés peroxovanadium (pV), bpV(phen) et potassium bisperoxy(pyridine-2-carboxylato)oxovanadate (Vi) (bpV(pic)), contrôlent la progression de la leishmaniose de façon similaire en modulant l'action microbicide dépendante du monoxyde d'azote (NO). Nous avons observé que l'injection de pV peut induire rapidement et de façon transitoire l'expression de la monoxyde d'azote synthase (iNOS) dans le foie des souris et augmente les taux circulants de NO ce qui coïncident avec l'élévation de la phosphorylation des phosphotyrosines (Tyr(P)) du foie. De plus, le traitement des souris avec les composés pV contrôle complètement la progression de la leishmaniose de façon dépendante du NO car l'inhibition d'iNOS avec l'aminoguanidine bloque complètement la protection médiée par le pV. De plus, l'évidence de l'implication du NO dans la protection médiée par le bpV(phen) envers la leishmaniose cutanée est renforcée par l'incapacité des souris mutantes NRAMP^{-/-}, iNOS^{-/-} traitées au bpV(phen) à contrôler l'infection à *L. major*. Nous avons aussi observé, en utilisant un modèle de la poche d'air chez la souris pour étudier la réponse inflammatoire précoce, que le bpV(phen) pouvait moduler fortement le recrutement de neutrophiles induit par le *L. major* ce qui coïncide avec l'élévation de l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6) et de chimiokines (MCP-1, MIP-2). Ces fonctions immunes et inflammatoires pourraient être impliquées dans le mécanisme de protection engendré par le bpV(phen) restreignant la croissance des amastigotes de *L. major* dans les nodules lymphoïdes de souris. En somme, cette étude nous a permis d'établir les événements immunologiques et fonctionnels *in vivo* impliqués dans la protection induite par les pV contre la leishmaniose. Nous avons obtenu des évidences

démontrant le rôle pivot joué par le NO dans ce processus. En conclusion, les composés peroxovanadiums sont de nouvelles molécules qui pourraient représenter des agents thérapeutiques prometteurs pour le contrôle des pathogènes en favorisant la réponse immune.

PEROXOVANADIUM-MEDIATED PROTECTION AGAINST LEISHMANIASIS:
ROLE OF THE MODULATION OF NITRIC OXIDE*

Claudine Matte^a, Jean-François Marquis^a, Philippe Gros^b,
Robert Faure^c, Barry I. Posner^d and Martin Olivier^{a†}

^a Centre de Recherche en Infectiologie and Département de Biologie Médicale, ^c Unité de Recherche en Pédiatrie and Département de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy (Québec) Canada G1V 4G2, and ^b Department of Biochemistry and ^d Department of Medicine, McGill University, Montréal, Canada H3A 1A1

† Address correspondence to:
Martin OLIVIER, Ph.D.
Centre en Recherche en Infectiologie, RC-709
Centre Hospitalier Universitaire de Québec
Pavillon CHUL,
2705 boul. Laurier
Ste-Foy (Québec), Canada G1V 4G2
Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2715.
E-mail: martin.olivier@crchul.ulaval.ca

Running title: *In vivo* nitric oxide modulation by PTP inhibitors.

SUMMARY

A considerable effort is underway to understand the signaling mechanisms involved in *Leishmania* infection. We have recently demonstrated that the phosphotyrosine phosphatase (PTP) inhibitor potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxo-vanadate(Vi) (bpV(phen)) has the ability to markedly decrease the progression of cutaneous and visceral murine leishmaniasis (*J Biol Chem* (1998) 273, 13944-13949). In the present study, we were interested to identify the mechanisms that are responsible for this protective effect, *in vivo*. Here we report that two potent peroxovanadium compounds (pV), bpV(phen) and potassium bisperoxo(pyridine-2-carboxylato)oxovanadate(Vi) (bpV(pic)) control leishmaniasis progression in a similar manner by modulating nitric oxide (NO)-dependent microbicidal action. We observed that pV injection can rapidly and transiently stimulate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in mice livers and enhance circulating NO levels in parallel with elevation of liver protein phosphotyrosine (Tyr(P)) phosphorylation. Moreover, the treatment of mice with pV compounds completely controlled leishmaniasis progression in a NO-dependent manner, since inhibition of iNOS with aminoguanidine completely reversed this pV-mediated protection. The evidence of NO involvement in bpV(phen)-mediated protection against cutaneous leishmaniasis was further reinforced by the incapacity of bpV(phen)-treated *Nramp*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} mutant mice to control *L. major* infections. We also observed, using an air pouch model to study early inflammatory responses, that bpV(phen) can strongly modulate *L. major*-induced neutrophil recruitment, as well as pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6) and chemokine (MCP-1, MIP-2) expression and secretion. These immune and inflammatory functions could be involved in the bpV(phen)-mediated protective mechanism that restricts growth of *L. major* amastigotes in mouse popliteal lymph nodes. Overall, this study has allowed us to establish the *in vivo* functional and immunological events involved in pV-induced protection against leishmaniasis. We have obtained clear evidence demonstrating the

pivotal role played by NO in this process. In conclusion, these new molecules show promise as a therapeutic agents for controlling pathogens by up-regulating the immune response.

INTRODUCTION

Infection involving the intracellular protozoan parasite *Leishmania* is estimated to affect more than 15 million people around the world with 400 000 new cases occurring every year (1). Humans infected with this pathogen develop different pathologies, i.e. cutaneous, muco-cutaneous and lethal visceral affliction depending on the *Leishmania* species involved. The incidence of leishmaniasis is on the rise worldwide due to increased travel, the lack of vaccines, difficulty in controlling vectors, and an increase in resistance to chemotherapy (2). Several lethal intracellular pathogens, e.g. HIV, *Mycobacteria* and *Yersinia* along with *Leishmania* (3-10), can impair phagocyte functions, interfering with their capacity to elicit a protective immune response resulting in the establishment and progression of infection.

We previously reported that several *Leishmania*-induced macrophage (MØ)¹ dysfunctions were related in part to the alteration of Ca²⁺- and protein kinase C (PKC)-dependent signaling pathways (3, 4). Dysregulation of JAK2-dependent signaling events in *Leishmania*-infected MØ (11, 12) could possibly account for the inhibition of several of these agonist-inducible MØ functions (3, 4, 7, 13-20), for example IFN- γ -induced NO generation. More recently, we established that the host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 was responsible for JAK2 inactivation during the course of *Leishmania* infection in MØ (12). It is necessary for cells that both protein tyrosine phosphatases (PTP) and kinases (PTK) maintain a physiological balance to sustain normal regulation of phosphotyrosine (Tyr(P))-dependent events. It was thus important to determine whether modulation of host PTP could favor protection against leishmaniasis. In fact, we have reported that vanadium peroxides (pV), recognized for their selective and potent inhibitory action toward PTPs (reviewed in 21), were able to protect animals against cutaneous and visceral leishmaniasis progression (22), thus reinforcing the hypothesis that host PTPs play an important role in the progression of *Leishmania*-related pathogenesis.

Nitric oxide (NO) is a molecule secreted by MØ in response to IFN- γ stimulation, and is regulated by Tyr(P)-dependent events (15, 22). Its pivotal role in the control of *Leishmania* progression *in vivo* has been well established (23, 24). We have already obtained evidence that inhibition of MØ PTP by the pV compound bpV(phen) can significantly reduce the capacity of the *Leishmania* parasite to survive within its host cell (22). This pV-mediated *in vitro* protection against *Leishmania* infection paralleled an increased IFN γ -inducible MØ NO generation. Both events were completely reverted by L-NMMA, a well known iNOS inhibitor. This further reinforced the notion that NO is a key element in pV-mediated control of *Leishmania* infection. The capacity of this pathogen to modulate negative signaling molecules such as the PTP SHP-1 (12) may represent an important mechanism responsible for NO down-modulation (20). Whereas our *in vitro* experiments suggest NO to be responsible for this leishmanicidal activity, we did not investigate precisely which immunological mechanism was driving the *in vivo* bpV(phen)-mediated protection against visceral and cutaneous leishmaniasis (22). Thus, we wished to identify and evaluate *in vivo*, the immunological and cellular events that underlie pV-mediated protection against leishmaniasis. The present study established that NO is one of the key molecules responsible for pV-mediated protection against leishmaniasis, and further reveals that modulation of inflammatory events by bpV(phen) could play an important role in this process.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Isotopes were obtained from ICN Pharmaceuticals Canada Ltd. (Montréal, QC Canada). The antiphosphotyrosine antibody (clone 4G10) was purchased from Upstate Biotechnology Inc. (UBI, Lake Placid, NY) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) antibody from Cedarlane Laboratories Limited (Cedarlane, Hornby, ON, Canada). The iNOS inhibitor aminoguanidine and the lipopolysaccharide (LPS) (*E. coli*, serotype 0111:B4) were purchased from SIGMA (St-Louis, MO, USA). The peroxovanadium complexes (PTP inhibitors) used in this study were $K(\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{phen})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, and $\text{K}_2(\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{pic})\cdot \text{H}_2\text{O}$, or bpV(phen) and bpV(pic), respectively, and were synthesized as we previously described (25). BALB/c mice (6-8 weeks old female, 20-30g body weight (bwt)) were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). *Nramp1*^{-/-} and *Nramp1*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} mice were generated and bred at the McGill University animal facility. Briefly, *Nramp1*^{-/-} null mutants on 129 sv background were crossed to *iNOS*^{-/-} null mutants (on C57BL/6J background). Double heterozygotes from the cross (*Nramp1*^{+/-}, *iNOS*^{+/-}) were intercrossed to generate the double null mutant, which was then bred and used in our study. Endotoxin-free PBS was purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY) and used in all experiments performed for this study.

Parasite culture—*Leishmania* promastigotes were grown at room temperature and maintained in the laboratory by weekly transfers in SDM-79 culture medium (SDM) as previously described (18,26).

In vivo peroxovanadium compounds injection—Mice were intraperitoneally injected with either bpV(pic), bpV(phen) at a dose of 2.5 $\mu\text{mol}/30\text{g}$ of bwt (22), LPS (20 μg in 500 μl of PBS) and endotoxin-free PBS. At different intervals (0, 2, 4, 8, 12 and 24 hour) thereafter, the mice were anesthetised, bled, and their livers collected. Circulating nitrate was measured in serum using the Greiss reaction as previously described (27,28).

Western blotting—Liver samples were collected, homogenized in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl, 10% glycerol (v/v), 1% Nonidet P-40 (v/v), 25 μ M nitrophenyl guanidinobenzoate, 10 μ M NaF, 1 mM sodium ortho-vanadate (Vi), 25 μ g/ml leupeptin and aprotinin). The lysates (20 μ g per lane), were subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis and the separated proteins then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) as previously described (22). After overnight blocking in TBS-T containing 1% gelatin followed by washing, the membranes were incubated with an anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10, UBI), washed with TBS-T and incubated with anti-mouse HRP-conjugated antibody (Gibco BRL). Results were visualized using ECL Western blotting detection system (Amersham Canada, Oakville, ON, Canada). In addition, inducible nitric oxide synthase (iNOS) antibody was used to reveal the level of expression of M \emptyset iNOS protein in liver tissue from mice treated or not with pV compounds.

In vivo protozoan infections and pV treatments—The BALB/c mice were injected daily with either bpV(pic), bpV(phen) (2.5 μ mol/30g of bwt, (500 nM) i.p. injection) and endotoxin-free PBS two days prior to their infection with parasites (i.e. *Leishmania major* and *Leishmania donovani*) and further daily injected for a period of 2-4 weeks post-infection as we previously described (22). In certain experiments, mice were also treated twice a day with the iNOS inhibitor aminoguanidine hemisulfate salt (Sigma; 5-9 mg in 200 μ l of pyrogen-free saline) as described by Jacobs et al. (28) to evaluate the implication of NO in the prophylactic and curative actions of these compounds. In order to precisely establish the role played by NO in bpV(phen)-mediated protection against leishmaniasis, *Nramp1*^{-/-} mutant mice (natural-resistance-associated M \emptyset protein) that we previously created in Dr. Philippe Gros laboratory (29) were backcrossed with *iNOS*^{-/-} mutant mice (kindly provided by Dr. Carl Nathan, Cornell Medical College, New York, USA) to yield *Nramp1*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} double mutants. The pV-treated and untreated animals were infected as described above and infection followed over a 4-week period. In these

different experimental groups, animals were inoculated with *L. major* (5×10^6 stationary phase promastigotes, s.c. injection in hind footpad) and *L. donovani* (10^7 stationary phase promastigotes, injected i.v. in tail vein). Footpad inflammation and parasitic load were monitored as we previously described (22).

Air pouch and leukocyte migration—Air pouches were raised on the dorsum of BALB/c mice by subcutaneous injection of 3 ml of sterile air on day 0 and 2.5 ml on day 3 as previously described by others (30). At day 7, animals were inoculated, or not, intraperitoneally with bpV(phen) 1-2 hr prior to injection into the pouch of 1 ml of endotoxin-free PBS containing or not, LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) and 1×10^7 *L. major* stationary phase promastigotes. Six hours post-inoculation, pouches were washed with a total of 5 ml of endotoxin-free PBS to collect leukocytes recruited into the exudate. Samples were used immediately or kept at -20°C for later evaluation. Enumeration of recruited cells was determined by direct count with a hemacytometer and recruited leukocytes population microscopically identified on Diff-Quick-stained cytopsin preparation.

RNAse protection assay— Total RNA was extracted from exudate cells using TRIzol reagent (Life Technologies, Inc.). Ten micrograms of RNA were subjected to a RNAse protection assay using the mCK-5 Riboquant kit (Pharmingen, Mississauga, ON) following manufacturer's instructions. Briefly, the probe was labeled for 1 hr at 37°C with $\alpha^{32}\text{-P}$ UTP, GACU ribonucleotide mix, DTT, 5X transcription buffer, RPA template set, RNasin and T7 polymerase. Then, DNase was added to the labeled material and incubated for 30 min at 37°C . Phenol/chloroform extraction was followed by chloroform:isoamyl extraction and the resulting aqueous phase was precipitated with 4 M ammonium acetate and ice cold EtOH (100%) for 30 min at -70°C . After centrifugation, the pellet was washed with ice cold EtOH (90%) and air-dried for 10 min. The pellet was then dissolved in hybridization buffer and stored at -20°C until use. Then RNA samples were incubated with $\alpha^{32}\text{-P}$ -labeled probe (3×10^5 cpm/ μl) for 12-16 hours (56°C). RNAse treatment (45 min at 30°C) was initiated by addition of the RNAse cocktail. Following

incubation, proteinase K cocktail was mixed into the RNase digests for 15 min (37°C). A phenol/chloroform extraction was performed, then RNA was precipitated by addition of 4 M ammonium acetate and ice cold EtOH (100%) for 30 min (-70°C). After a brief wash with ice cold EtOH (90%), the pellet was air-dried and resuspended in loading buffer. The samples were subjected to a SDS-PAGE electrophoresis (5%). The resulting gel was dried and the protected RNA visualized by autoradiography. The probe (1000-2000 cpm/lane) was diluted in loading buffer to serve as size marker.

ELISA— Levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6) and chemokines (MCP-1, MIP-2) secreted in the air pouch exudates in response to *Leishmania* were monitored as we previously described (31) or as specified by the manufacturer for MCP-1 and MIP-2 ELISA kit (PharMingen Canada Inc., Ontario, Canada).

Statistical analyses— Statistically significant differences between groups were performed with the analysis of variance (ANOVA) module of SAS software (version 6.07, SAS Institute, Cary, NC) using the Fisher least significant difference test. *P* values <0.05 were considered to be statistically significant (*P* values are given in the figure legends). All data are presented as mean \pm SEM.

RESULTS AND DISCUSSION

Leishmania-induced MØ dysfunction has been correlated with abnormal transductional mechanisms involving diverse second messengers (3-7, 11-20) including the PTK JAK2 (12). We recently obtained evidence that host PTPs such as SHP-1 (12, 22) may have an important role to play in the deactivation of host cell signaling which may necessitate Tyr(P) events at different steps in the biochemical cascade. This finding revealed that the modulation of Tyr(P) phosphorylation-based signaling cascades represents an important mechanism whereby pathogens may alter host cell functions. In support of this concept, we further reported that modulation of host and parasite PTP with pV compounds effectively abolished *Leishmania* infection *in vitro* and *in vivo* (22). However, we did not establish the precise mechanism responsible for this protection, since both parasite growth and NO generation *in vitro* were abolished and exacerbated respectively by bpV(phen) treatment. These observations highlight the fact that the apparent potency of pV compounds, along with their relatively simple and versatile structure, could represent a new avenue for the development of novel therapeutic agents against parasitic infections. In this study, we wanted to decipher the precise protective mechanisms mediated by bpV(phen) treatment concomitantly using the bpV(pic), which has not previously shown capacity to block axenic *Leishmania* growth in culture, but has demonstrated similar capacity as bpV(phen) to activate phagocytes and up-regulate IFN γ -mediated MØ NO generation (22).

We monitored the capacity of pV compounds, bpV(phen) and bpV(pic), to modulate Tyr(P)-dependent events represented by iNOS protein expression in liver tissue and an increase of circulating NO (Fig.1). As reported in Figure 1A, injection of bpV(pic) and bpV(phen) in BALB/c mice was shown to rapidly up-regulate liver protein Tyr(P) phosphorylation, which peaked 2 to 4 hours post-inoculation and returned transiently to basal levels by 24 hours. It is noteworthy that whereas several proteins of comparable MW (kDa) were identically phosphorylated following both pV compounds, bpV(pic) exerted a

more marked effect on proteins of high MW when compared to bpV(phen) which had lesser overall, and much more evenly distributed impact. This observation demonstrates that these products are powerful signaling modulators and that the nature of the ancillary ligand on the vanadate derivatives is important in selective PTP inhibition (32). *In vivo* modulation of Typ(P)-dependent events was paralleled by an increase of iNOS protein expression in liver from pV-injected animals (Fig. 1B), thus illustrating the ability of that pV compounds to upregulate *in vivo* a putative molecule that is likely to be implicated in the protective actions against the afore mentioned leishmaniasis (22). iNOS protein expression was strongly induced by each compound in a transient manner (Fig. 1B) and active iNOS protein was generated since NO production was detectable in the blood (Fig. 1C). The importance of this series of experiments lies in the observation that administration of different pV compounds, in animals, can modulate NO generation *in vivo*. It further strengthens our hypothesis that pV-mediated NO modulation *in vivo* could represent one of the key mechanisms by which these compounds can control *Leishmania* infections.

In view of the above observations, experiments were performed to establish whether bpV(phen) and bpV(pic) were similarly capable of controlling murine leishmaniasis development (22), and to determine the extent to which pV-mediated NO generation, *in vivo*, might be implicated in this protection. This was approached using the well known iNOS inhibitor, aminoguanidine. Infection by *Leishmania major*, the causative agent of cutaneous leishmaniasis, was inhibited by more than 75% ($p < 0.01$) in both bpV(phen)- and bpV(pic)-treated BALB/c mice (Fig. 2A,B and C). The pV-mediated protection against cutaneous leishmaniasis development was completely reversed by aminoguanidine, a well-known iNOS inhibitor. As shown in Fig. 2A, mice treated daily with bpV(phen) and bpV(pic) ($2.5 \mu\text{mol}/30\text{g}$ (500nM) of bwt, i.p. injection) over a 4-week period showed a significant reduction of footpad inflammation compared to the PBS controls. The pV treatments not only reduced the inflammation of the footpad, but also

completely blocked the development of the cutaneous lesion (Fig. 2C) as we had previously reported for bpV(phen) (22). But as expected, considering our previous observation that pV compounds can modulate NO generation *in vitro* (22), after inhibition of iNOS by aminoguanidine both footpad inflammation and skin lesion development had completely reverted to the control levels (Fig. 2A and B). These last data bring clear evidence supporting the pivotal role played by NO in pV-mediated control over cutaneous leishmaniasis. Both bpV(phen) and bpV(pic) reduced cutaneous leishmaniasis pathological features and almost completely reduced parasitic load from the popliteal lymph node further reflected by complete absence of hepatic involvement (visceralization) (Fig. 2B). Nevertheless, it should be noted that although pV-treated groups receiving aminoguanidine had significantly increased parasite loads ($p < 0.05$) in comparison to their respective controls, they could not be considered elevated when compared to PBS-treated animals (Fig. 2B). This result provides important information concerning *L. major*-related pathogenesis, because it reveals that NO not only has the capacity to kill the parasite, but might also modulate other immunological events involved in the control of inflammation and tissue destruction induced by the infection. Additionally, as data in Figure 2B suggest, other leishmanicidal mechanisms restraining parasite growth might be pV-modulated. For instance, oxygen radical generation and increased phagosome-lysosome fusion could possibly account for the reduced parasitic load enumerated in pV/aminoguanidine-treated groups. On the other hand, since inhibition of PTP by pV compounds can modulate diverse PTK activities *in vivo* (22,25) as indicated by the transient Tyr(P) hyperphosphorylation reported (Fig. 1A), and knowing that certain immunological events such as inflammatory cell recruitment in response to infections and inflammatory insults are regulated by PTK of the Src-family such as Hck and Fgr (33) potentially regulated by diverse PTP, it is plausible that pV treatment augments the early inflammatory response thus curbing parasite growth, even in absence of NO. Recently, it was reported that neutrophils play an important role in the control of cutaneous

leishmaniasis progression and it was shown that depletion of neutrophils in mice leads to uncontrolled and exacerbated *L. major* infection (34). Thus, if we can find a way to reinforce neutrophils mediated leishmanicidal activity, it might be possible to better control cutaneous leishmaniasis installment and progression.

As shown in Fig. 3, bpV(phen) and bpV(pic) were tested on visceral leishmaniasis and NO-mediated protection was evaluated. In the case of cutaneous leishmaniasis, both PTP inhibitors were capable to completely reduce the liver parasitic load at 2 weeks post-infection, whereas hepatic infestation of PBS-treated animals was still elevated as we previously reported (22). Of interest, contrary to *L. major* infection (Fig. 2), *L. donovani*-infected mice simultaneously treated with pV and aminoguanidine were shown to have similar liver parasitic load to their untreated infected counterpart (Fig. 3). This complete aminoguanidine-mediated reversal of the protective action of pV's against visceral leishmaniasis suggests that NO plays a pivotal role in the regulation of *L. donovani* infection. This finding concurs with the recent observation reported by Murray and Nathan (35) who showed that *L. donovani* infection is unrestrained in *iNOS* KO mice. Such discrepancy in *Leishmania*-induced pathogenesis further reveals that, whereas NO seems to be a pivotal microbicidal molecules controlling *Leishmania* infection, other immunological and cellular events, such as the inflammatory response, could also modulate *Leishmania* species-specific pathogenesis development, and this especially in the context of cutaneous leishmaniasis.

We also designed experiments using knock-out mice that would support our idea that pV-mediated protection against *L. major*-induced footpad inflammation involved NO. *Nramp*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} mice were infected with *L. major* and then treated with bpV(phen). The pathogenic development was then monitored over a 4 weeks period (*Nramp*^{-/-} KO mice were used as background controls). As reported in Figure 4, footpad inflammation of control mice treated with bpV(phen) was significantly reduced ($p < 0.05$) relative to their untreated counterparts. On the other hand, bpV(phen)-treated *Nramp*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} KO mice

showed no significant reduction of their footpad inflammation at any time during the course of *L. major* infection. Thus, this experiment firmly established a role for NO in pV-mediated anti-*Leishmania* action.

Overall, the first part of this study revealed that pV-mediated protective action against cutaneous and visceral leishmaniasis involved up-regulation of NO activation. Additionally, the results clearly indicated that pV-mediated protection was not due to the direct action of these compounds on parasite growth, as firmly supported by data obtained in the context of *L. donovani* infection where iNOS inhibition by aminoguanidine completely blocked the pV-mediated leishmanicidal action. As reported in Figure 2B, lymph node parasitic load was still significantly reduced by pV treatments even when iNOS was inhibited by aminoguanidine. It was thus of interest to try to determine whether other immunological events could have participated in that parasitic load reduction. As we mentioned above, it was recently reported by Lima and colleagues (34) that rapid and massive infiltration of polymorphonuclear leucocytes (i.e. neutrophils and eosinophils) in response to *L. major* skin inoculation, was essential to the early control of *Leishmania* infection and its propagation. Thus, the intent of the next phase of this study was to establish whether bpV(phen) treatment could modify *L. major*-induced early inflammatory responses, in so doing to identify, at least in part the cellular mechanisms restraining parasitic growth in pV-treated animals receiving aminoguanidine.

With the use of a murine air pouch model, we investigated early inflammatory events that occur following *L. major* skin injection in bpV(phen)-treated animals. As shown in Figure 5A, both *L. major* and LPS (positive control) could induce significant leukocyte recruitment in air pouch exudates as measured 6 hours post-injection. Of interest, bpV(phen)-treated BALB/c mice, in response to *L. major* promastigotes (10^7 parasites/ml) intra-pouch injection, manifested a 5 times greater recruitment of cells within the same time period as compared to control. In addition, differential counts performed on Diff-Quick-stained cytopsin preparations from these cells revealed that

~ 70% of recruited leukocytes were neutrophils (18% eosinophils and 12% macrophages), whereas in untreated animals receiving *L. major* promastigotes ~48% of recruited cells were neutrophils with the rest of the cell population consisting of eosinophils (26%) and macrophages (26%). These data revealed that bpV(phen) is a good modulator of the early inflammatory response and could have a major impact on the progression of *L. major* infection since the dramatic increase in inflammatory cell recruitment consisted mainly of neutrophils, already recognized for their importance to restrain *Leishmania* pathogenesis (34). In parallel to this experiment, *in vivo* generation of *Leishmania*-induced NO and pro-inflammatory mediators in bpV(phen)-treated mice were measured in air pouch exudates. As reported in Figure 1, the present set of data further reinforces the idea that bpV(phen) is an excellent NO modulator as revealed by its enhancement of the generation in response to *L. major* infection (Fig. 6A). This elevated NO generation not only further increased the microbicidal activity observed in bpV(phen)-treated animals, but also partly explained the strong inflammatory response observed in bpV(phen)-treated animals since NO has been recognized as an important mediator of inflammation and regulator of neutrophil migration (36, 37). In addition, bpV(phen)-treatment has resulted in the elevation of some pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β) and chemokines (MCP-1 and MIP-2) measured in air pouch exudates of animals inoculated with *L. major* promastigotes (Fig. 6B). MIP-2 is recognized as a specific chemoattractant for neutrophils (38) whereas MCP-1 has been shown to be a powerful monocyte/macrophage recruiter to sites of inflammation. Additionally, the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 are well known chemokine modulators playing a pivotal role in the development of inflammation (39) including the regulation of MCP-1 and MIP-2 expression (40).

As shown in Figure 7, *in vivo* *Leishmania*-induced M ϕ chemokine gene expression —monitored with the use of a multi-probe RNase protection assay— in bpV(phen)-treated mice was significantly up-regulated for some of them (i.e. MIP-2 and MCP-1) in comparison to *L. major* control. Overall, these last experiments clearly

demonstrated the capacity of the pV compound bpV(phen) to up-regulate several inflammatory and immunological functions of the host in response to the pathogen *Leishmania* and may play an important role in the restriction of cutaneous leishmaniasis progression in mammals.

The capacity of the parasite *Leishmania* to alter host signaling systems leading to MØ functional inhibition (3, 4, 7, 11-20) has been recently shown to involve the PTP, SHP-1 (12). Such exploitations of the signaling systems modulated by PTP is believed to be crucial for the parasite survival and progression. Recently, we demonstrated that *in vitro* modulation of MØ PTP activity with pV led to the activation of NO and elimination of *Leishmania* infection (22). This observation is in agreement with the concept that NO plays a pivotal role in the control of leishmaniasis progression (23,24). A similarly observation was made *in vivo* that bpV(phen) injection conferred protection against visceral and cutaneous leishmaniasis (22) and in the present paper, we obtained clear evidences that *in vivo* PTP modulation by pV leads to NO activation and control over cutaneous and visceral leishmaniasis progression. Experiments performed with the iNOS inhibitor aminoguanidine further revealed that the bpV(phen) mediates, *in vivo*, the activation of several other inflammatory and immunological events (i.e. neutrophils recruitment, cytokine and chemokine secretion) that must be involved in the restraint of cutaneous leishmaniasis progression. Future experiments will be planned to uncover the implication of these events in the pV-mediated protective issue reported herein.

In conclusion, the results of the present study emphasize the important role played by host PTP in the progression of *Leishmania* infection. Most importantly, our findings have revealed that the pV-mediated protection against *Leishmania* infection is mainly due to the induction of NO generation. Additionally, our results have clearly established that pV compounds are powerful immunomodulators that can prime early inflammatory responses in a way that contributes to restrain pathogen progression.

REFERENCES

1. Ashford, R.W., Desjeux, P., and De Raadt, P. (1992) *Parasitol. Today* **8**, 104-105
2. Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (1993) *Parasitol. Today* **9**, 150-1153
3. Olivier, M., Baimbridge, K.G., and Reiner, N.E. (1992) *J. Immunol.* **148**, 1188-1196
4. Olivier, M., Brownsey, R.W., and Reiner, N.E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7481-7485
5. Turco, S.J., and Descoteaux, A. (1992) *Ann. Rev. Microbiol.* **46**, 65-94
6. Olivier, M. (1996) *Parasitol. Today* **12**, 145-150
7. Reiner, N.E., Ng, W., Ma, T., and McMaster, W.R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4330-4334
8. Bliska, J.B., Guan, K., Dixon, J.E., and Falkow, S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1187-1191
9. Pinching, A.J., and Nye, K.E. (1990) *Immunol. Today* **11**, 256-259
10. Baldwin, G.C., Fleischmann, J., Chung, Y., Koyanagi, Y., Chen, I.S.Y., and Golde, D.W. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3933-3937
11. Nandan, D., and Reiner, N.E. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 4495-4500
12. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 3737-3744
13. Green, S.P., Hamilton, J.A., and Phillips, W.A. (1992) *Biochem. J.* **288**, 427-432
14. Greenberg, S., Chang, P., and Silverstein, S.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3897-3902
15. Dong, Z., Qi, X., Xie, K., and Fidler, I.J. (1993) *J. Immunol.* **151**, 2717-2724
16. Watling, D., Guschin, D., Muller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1993) *Nature* **366**, 166-170

17. Glaser, K.B., Sung, A., Bauer, J., and Weichman, B.M. (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**, 711-721
18. Olivier, M., and Tanner, C.E. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 467-471
19. Buchmuller-Rouiller, Y., and Mauel, J. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 587-593
20. Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S. and Liew, F.Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10984-10989
21. Tsiani, E., and Fantus, I.G. (1997) *Trends Endocrinol. Metab.* **8**, 51-58
22. Olivier, M., Romero-Gallo, B.J., Matte, C., Blanchette, J., Posner, B.I., Tremblay, M.J. and Faure, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 13944-13949
23. Stenger, S., Thüring, H., Röllinghoff, M., and Bogdan, C. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 783-793
24. Stenger, S., Donhauser, N., Thüring, H., Röllinghoff, M., and Bogdan, C. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 1501-1514
25. Posner, B.I., Faure, R., Burgess, J.W., Bevan, A.P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Ng, J.B., Hall, D.A., Lum, B.S., and Shaver, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4596-4604
26. White, T.C., Fase-Fowler, F., and Luenen, H., Calafat, J., and Borst, P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16977-16983
27. Evans, T.G., Thai, L., Granger, D.L., and Jr. Hibbs, J.B. (1993) *J. Immunol.* **151**, 907-915
28. Jacobs, P., et al. (1995) *J. Immunol.* **155**, 5306.
29. Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jotly, S., and Gros, P. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 655-666
30. Edwards, J.C., Sedgwick, A.D., and Willoughby, D.A.. (1981) *J. Pathol.* **134**, 147-156

31. Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.M., Simard, M., Olivier, M., and Bergeron, M.G. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 912-922
32. Bevan, A.P., Burgess, J.W., Yale, J.F., Drake, P.G., Lachance, D., Baquiran, G., Shaver, A., and Posner, B.I. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, E60-E66
33. Lowell, C.A., and Berton, G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7580-7584
34. Lima, G.M., Vallochi, A.L., Silva, U.R., Bevilacqua, E.M., Kiffer, M.M., and Abrahamsohn, I.A. (1998) *Immunol. Lett.* **64**, 145-151
35. Murray, H.W., and Nathan, C.F. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 741-746
36. Hobbs, A.J., Higgs, A., and Moncada, S. (1999) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 191-220
37. Ajuevor, M.N., Virag, L., Flower, R.J., Perretti, M., and Szabo, C. (1998) *Immunology* **95**, 625-630
38. Yan, X.T., Tumpey, T.M., Kunkel, S.L., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (1998) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 1854-1862
39. Duong, M., Ouellet, N., Simard, M., Bergeron, Y., Olivier, M., and Bergeron M.G.B. (1998) *J. Infect. Dis.* **178**, 1472-1482
40. Tam, F.W., Karkar, A.M., Smith, J., Yoshimura, T., Steinkasserer, Kurrle, R., Langner, K., and Rees, A.J. (1996) *Kidney Int.* **49**, 715-721

FOOTNOTES

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to M.O.. M.O. is a member of a MRC Group in Infectious Diseases, and a Burroughs Wellcome Fund awardee in Molecular Parasitology. M.O. and R.F. hold Junior 2 scholarship awards from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). P.G. is an International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute and a Senior Scientist of the MRC.

¹ The abbreviations used are: iNOS, inducible nitric oxide synthase gene; MØ, macrophage; NO, nitric oxide; PTK, protein tyrosine kinase; PTP, protein tyrosine phosphatase; pV, peroxovanadium; Tyr(P), phosphotyrosine; Vi, Sodium-orthovanadate.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Modulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by pV compounds *in vivo*.

A, Consequence of pV treatments on liver Tyr(P) proteins pattern. BALB/c mice were injected intraperitoneally (i.p.) with bpV(phen) or bpV(pic) (2.5 $\mu\text{mol}/30\text{g}$ of body weight (bwt); 500 nM) and at different time thereafter (2,4,8,12 and 24 hr), livers were collected and homogenized in presence of lysing buffer with a glass pestle. Collected proteins were subjected to Western blotting and Tyr(P) pattern revealed using an anti-phosphotyrosine as described in Experimental procedures. As negative control, animal were injected with PBS (-). Injection of LPS at a dose of 20 μg was used as positive control (time of collection 8 hr post-inoculation). Results are representative of 1 out of 4 mice per time point. B, Induction of iNOS production by pV treatment. Protein isolation and preparation from liver of pV-treated BALB/c mice was performed as described above. Level of iNOS protein expressed in liver of pV-treated mice was revealed using an anti-iNOS antibody. Results are representative of 1 out of 4 mice. C, Circulating nitric oxide (NO) measurement. At different time following pV injections, blood was collected and serum kept. The circulating NO was evaluated by measuring the nitrite in mouse serum with the Greiss reagent. Circulating NO induced by LPS was measured 8hr post-inoculation (383 μM). Results represent the mean \pm SEM of data obtained from 4 different animals. Experiments have been repeated at least twice. Production of NO was significantly increased ($p < 0.05$) in comparison to PBS-treated animals.

Fig. 2. Effects of aminoguanidine, an iNOS inhibitor, on capacity of pV compounds to regulate cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. A, *Leishmania major* infection in mice (5×10^6 stationary phase promastigotes, s.c. injection in foot pad). In this experiment, animals have been subjected to daily PBS, bpV(phen) and bpV(pic) treatments over a period of 4 weeks. The progression of the infection is expressed as the net foot pad volume (mm^3) increase and each time points represent the mean \pm SEM values obtained for 5 animals. *Reduction of foot pad inflammation and lesion development (see Fig. 1B) for bpV(phen)- and bpV(pic)-treated animals was completely and significantly ($p < 0.01$, Student's *t* test) reverted by aminoguanidine treatments (Amino; 9mg/twice/day) in comparison to untreated counterpart. This experiment is representative of 2 experiments separately performed. B, Effect of aminoguanidine on liver and popliteal lymph node parasitic loads in pV-treated *L. major*-infected BALB/c mice. At 4 weeks post-infection, popliteal lymph nodes and livers from experimental groups were dissected and impression smears of the organ were giemsa-stained in order to evaluate the parasitic load (*Leishmania* units; LU). Each time point represents the values obtained for 5 animals. Reduction of lymph node and liver parasitic load from bpV(phen)- and bpV(pic)-treated animals were significant ($p < 0.05$, Student's *t* test) in comparison to control animals. Effect of nitric oxide has been reflected by increase of parasitic loads in popliteal lymph nodes of aminoguanidine-treated animals (expressed in fold increase over their respective control; F.I.). No further visceralization (LU in bracket) has been noted in these experimental groups in comparison to their pV-treated counterpart. C, *Leishmania major* infection in pV- and aminoguanidine-treated BALB/c mice at 4 weeks post-infection. As previously shown (22), foot pad inflammations and skin lesion developments caused by *L. major* infection were restrained by pV treatments. Of interest, aminoguanidine treatment has reverted this protection.

Fig. 3. Course of visceral leishmaniasis in pV-treated animals. *Leishmania donovani* infection in BALB/c mice. (10^7 stationary phase promastigotes, injected i.v. in tail vein). Mice have been subjected to the same treatments described above in Figure 2A. At 2 weeks post-infection, livers from infected animals were dissected and impression smears of the organ were giemsa-stained in order to evaluate their parasitic load (*Leishmania donovani* units; LDU). Each time point represents the values obtained for 5 animals. *Significant reduction of liver parasitic load from bpV(phen)- and bpV(pic)-treated animals ($p < 0.01$, Student's *t* test) in comparison to their PBS control was completely reverted by aminoguanidine treatments (Amino). This experiment is representative of 2 experiments separately performed.

Fig. 4. Effect of bpV(phen) treatment on cutaneous leishmaniasis progression in *Nramp*^{-/-}, *iNOS*^{-/-} mutant mice. Animals have been infected with *L. major* and bpV(phen)-treated as reported in the previous figures. Inflammation of the footpads has been followed over a period of 4 weeks. Whereas iNOS deficient mice (*Nramp*^{-/-}, *iNOS*^{-/-}) were not able to respond to bpV(phen) treatment, control animals (*Nramp*^{-/-}) treated with bpV(phen) were capable to significantly (*, $p < 0.01$) reduce footpad inflammation when compared to its PBS-treated counterpart. Results represents the mean \pm SD of experiments performed with 5-10 animals.

Fig. 5. *In vivo* Leishmania-induced leukocyte recruitments in pV treated mice.

A, Leukocyte recruitment in air pouch exudates of bpV(phen)-treated BALB/c mice in response to *L. major* promastigotes (10^7 parasites/ml) intra-pouch injection. Air pouches were raised on the back of 6-8 weeks old male BALB/c mice as described in Experimental procedures. Following injection of endotoxin-free PBS, LPS (20 μ g/ml), *L. major* and bpV(phen) (500 nM) + *L. major*, air pouch exudates were collected 6 hr post-inoculation. The pV compound has been injected i.p. 2 hr prior to parasite inoculation. Each time point represents the mean \pm SD (n= 4 mice) of 1 out of 2 experiments similarly performed. B, Recruited neutrophils, eosinophils and M ϕ enumerated in air pouch exudates collected following stimulation described above. Exudates were subjected to cytopspin preparation, fixed and Diff-Quick stained prior to differential count. Results obtained are representative of 2 experiments. Differences observed for total and specific leukocytes population recruited were all significant ($p < 0.01$, Student's *t* test) over their respective control.

Fig. 6. *In vivo* Leishmania-induced NO and pro-inflammatory mediator generations in pV-treated mice. A, NO level determination in air pouch exudates collected 6 hr post-inoculation of the following stimulant. Endotoxin-free PBS, *L. major* and bpV(phen) followed by *L. major*. Griess reaction has been performed to measure nitrate/nitrite levels as described in Experimental procedures. Values are the mean \pm SEM of 2 experiments performed independently. B, Evaluation of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β) and chemokines (MCP-1 and MIP-2) secreted in air pouch exudates collected as described above were measured by ELISA as described in Experimental procedures. Values are the mean \pm SEM of 2 experiments performed independently. Levels of cytokines and chemokines measured in exudate supernatants were significantly augmented ($p < 0.01$, Student's *t* test) in response to *L. major* infection and significantly further increased by bpV(phen) treatment when compared to their respective control. IL-6, IL-1 β , MCP-1 and MIP-2 secretion were respectively 12.8-, 2-, 8- and 6.8-time more secreted in *L. major* -injected bpV(phen)-treated animals compared to *L. major* alone. PBS control was equal to background.

Fig. 7. *In vivo* Leishmania-induced M ϕ chemokine gene expression in pV-treated mice.

Chemokine mRNA gene expression (CXC and CC classes) by cells recruited in the air pouches in response to endotoxin-free PBS, *L. major* (Lm) and bpV(phen) followed by Lm.. Expression of chemokine genes has been monitored using a multi-probe RNase protection assay as described in the Experimental procedures. Results obtained are representative of 3 experiments performed independently. Histograms showing chemokines gene expression are represented in integrated density (normalized to GAPDH) and fold increase over control (1.0) enumerated at the top of each histogram bars.

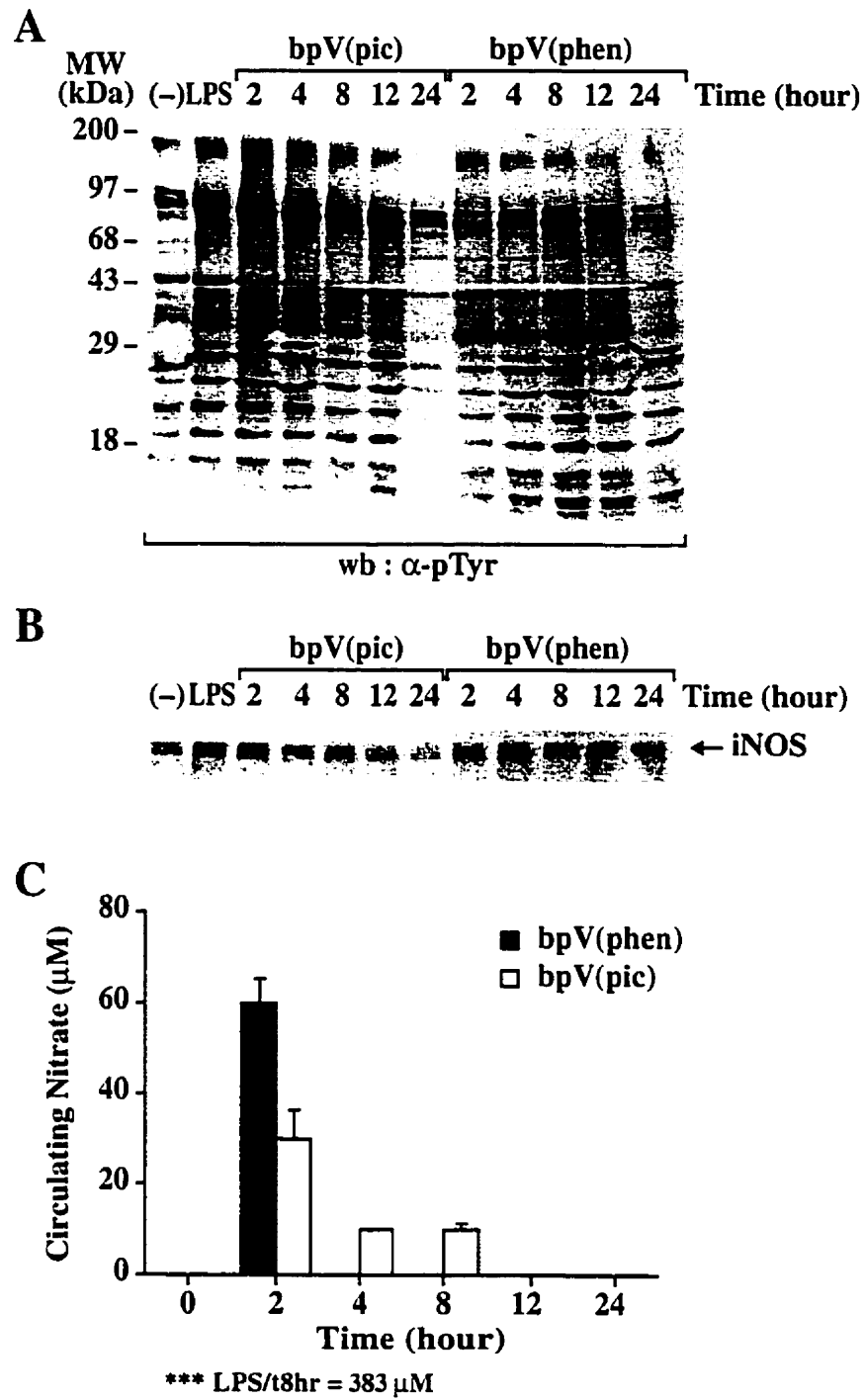


Figure 1

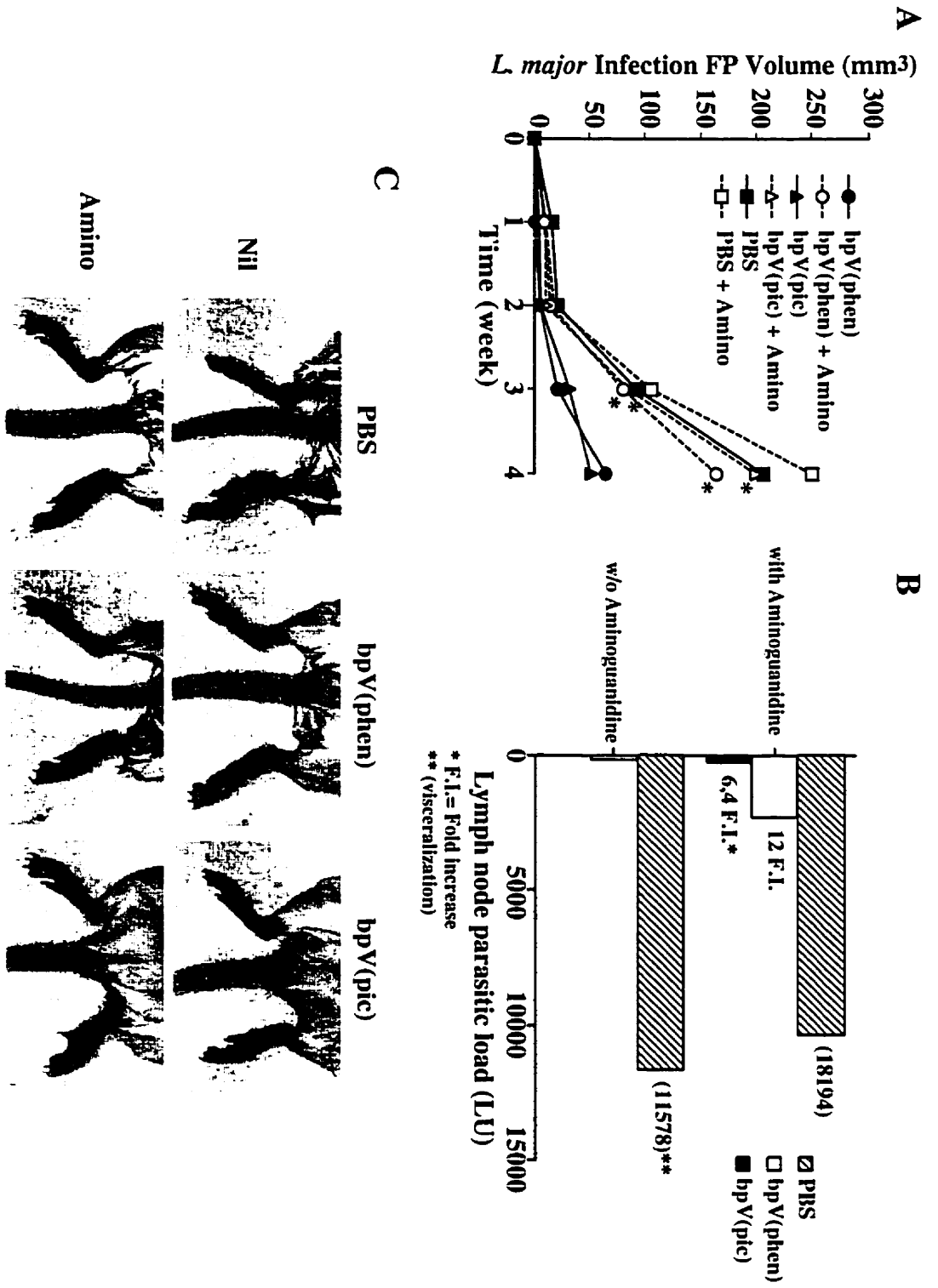


Figure 2

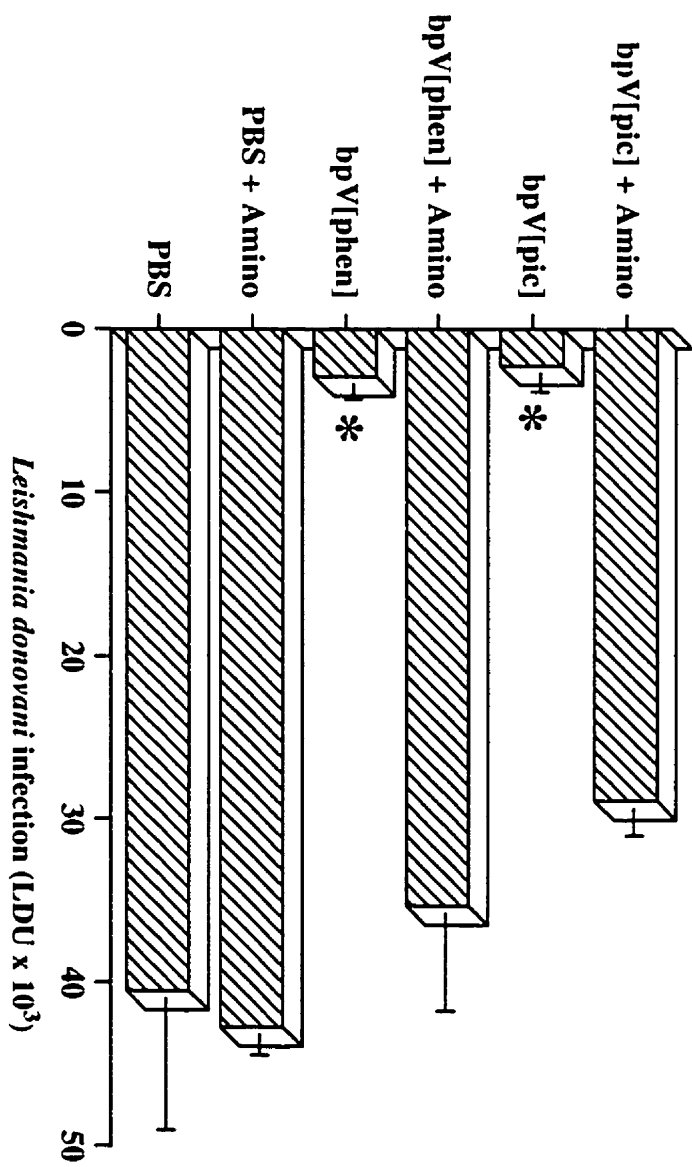


Figure 3

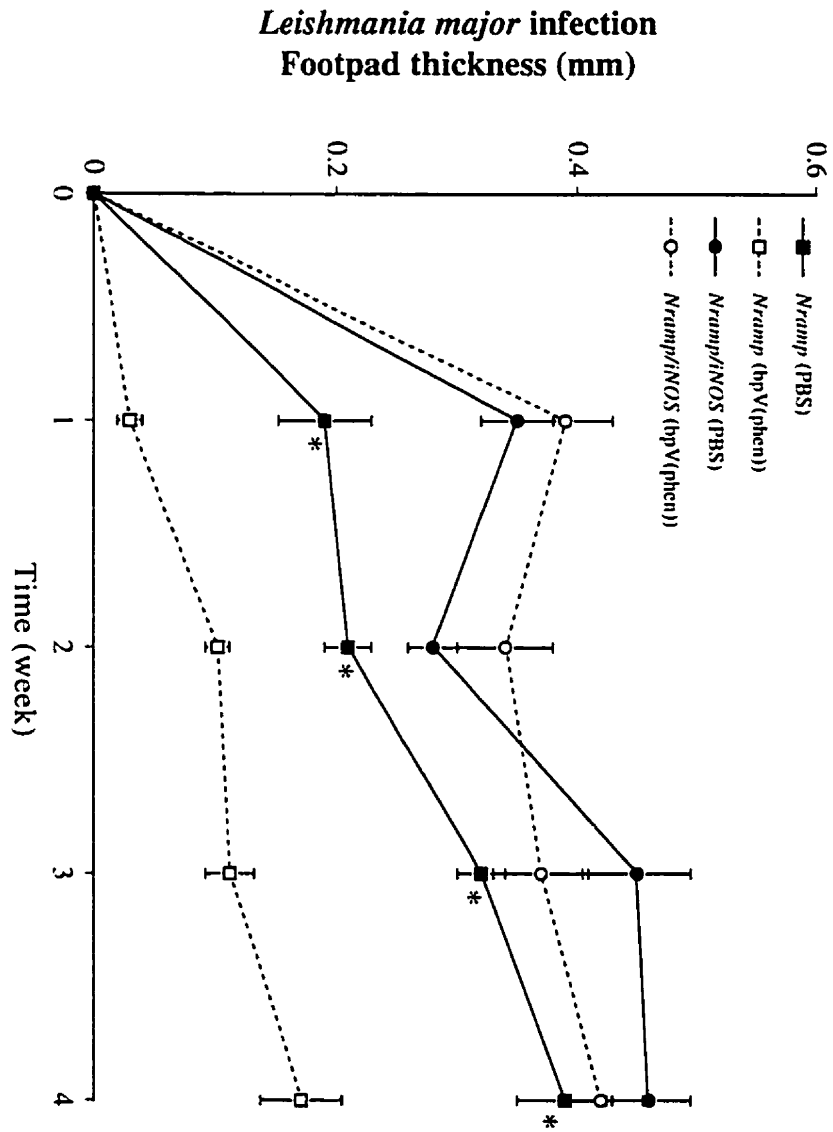
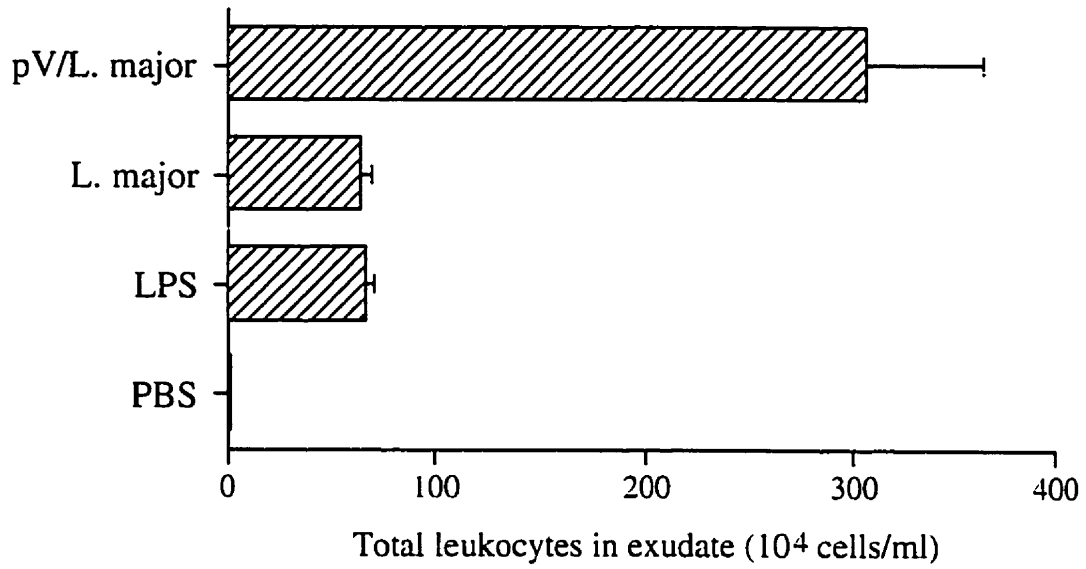


Figure 4

A



B

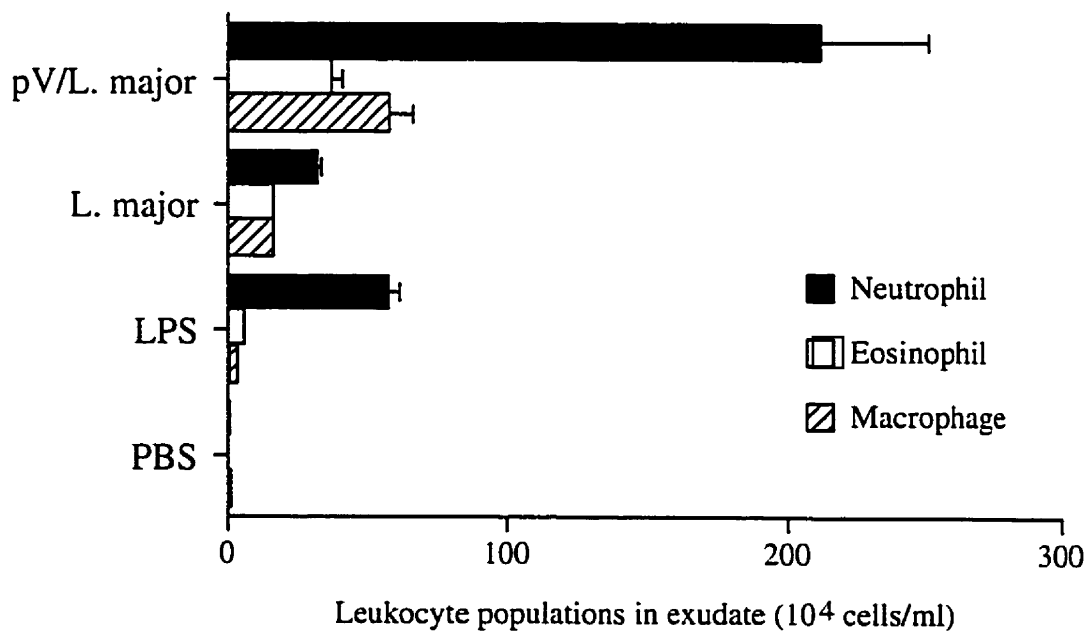


Figure 5

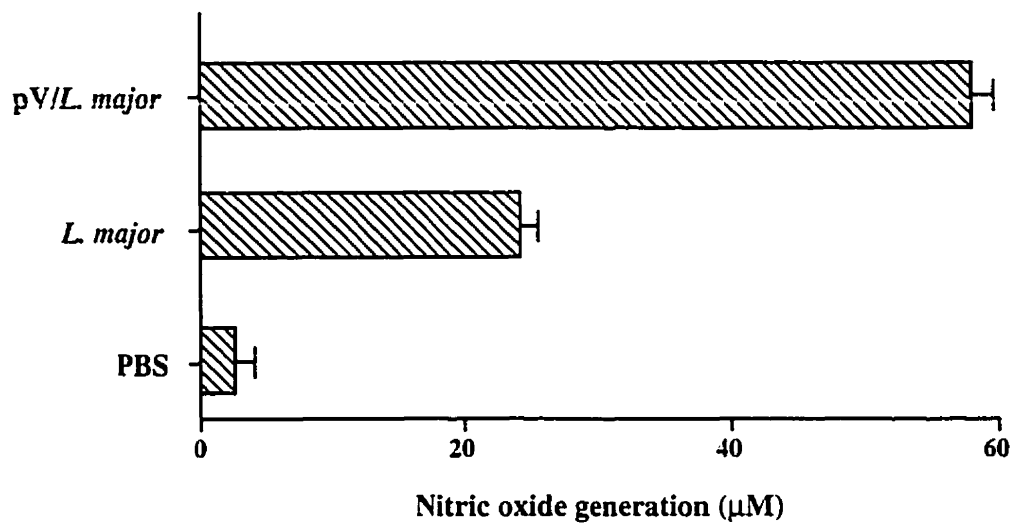
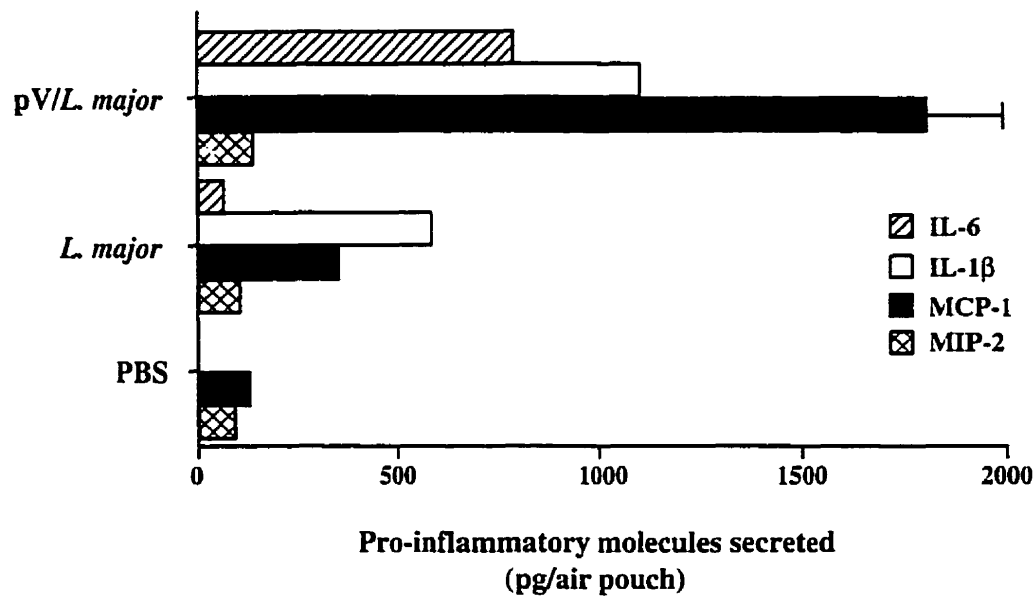
A**B**

Figure 6

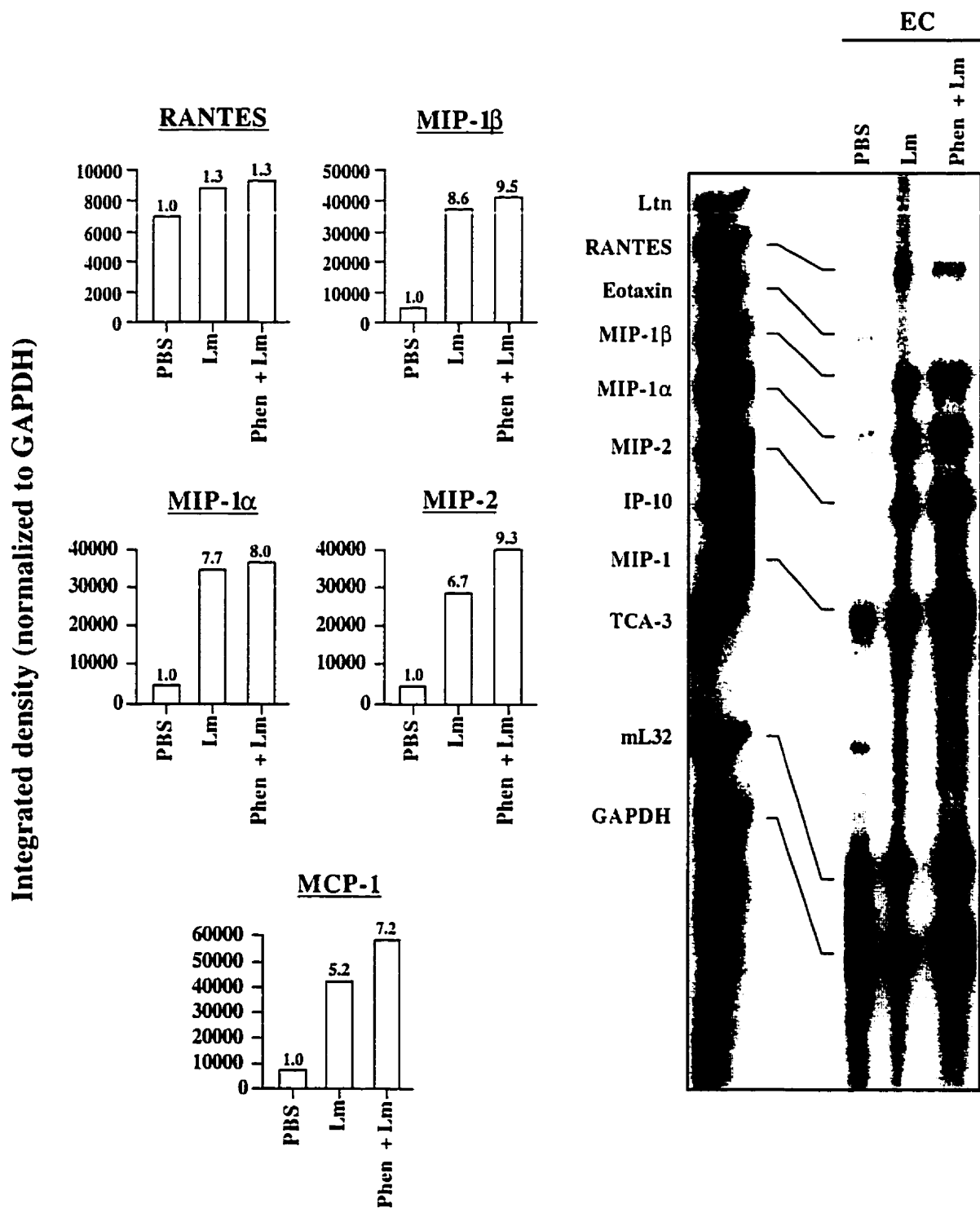


Figure 7

CHAPITRE 4

RÔLE DES PROTÉINES TYROSINE PHOSPHATASES DANS LA RÉGULATION DES GÈNES DE CHIMIOKINES

4.1 RÉSUMÉ

Le $K(VO(V_2)_2 \text{ phen} \cdot 3H_2O)$ (bpV(phen)) a été utilisé pour inhiber l'activité des protéines tyrosine phosphatases (PTPs) dont le rôle dans la régulation des chimiokines est toujours inconnue. Nous avons évalué l'effet de bpV(phen) sur la production de chimiokines par les macrophages murins B10R afin de préciser le rôle joué par les PTPs dans l'induction de ces agents chimioattractants. Le bpV(phen) seul induit l'expression de plusieurs gènes de chimiokines (RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 et MCP-1). Le traitement au bpV(phen) des macrophages stimulés au lipopolysaccharide augmente les taux d'ARNm tandis qu'il n'a aucun effet sur les macrophages infectés par le *Leishmania*. De plus, chez les macrophages déficients pour le gène de la SHP-1 (me), on a observé une meilleure induction de l'expression des chimiokines (RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2 et TCA-3) en comparaison avec des macrophages contrôles (Lmme). Lors de ces expériences, la MIP-2 a été particulièrement surexprimée au niveau tant de l'ARNm que la protéine. Ces résultats suggèrent que les PTPs, en particulier la SHP-1, agissent comme des régulateurs négatifs de la signalisation cellulaire impliquée dans l'expression des gènes de chimiokines (spécialement la MIP-2). Les souris déficientes en SHP-1 développent une maladie auto-immune et d'immunodéficience sévère. Cette maladie semble être exacerbée par l'action des PTPs sur l'expression des chimiokines induisant une inflammation importante. Ainsi, les chimiokines pourraient représenter d'excellentes cibles thérapeutiques pour le traitement de maladies auto-immunes et d'immunodéficiences.

Role of phosphotyrosine phosphatases in chemokine gene regulation

Claudine Matte¹, Katherine A. Siminovitch² and Martin Olivier^{1*}.

¹Centre de Recherche en Infectiologie and Département de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire du Québec, Pavillon CHUL, Ste-Foy (Québec); ²Departments of Medecine, Immunology and Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto (Ontario), Canada.

***To whom correspondence should be addressed:**

Martin OLIVIER, Ph.D.
Centre en Recherche en Infectiologie, RC-709
Centre Hospitalier Universitaire de Québec
Pavillon CHUL,
2705 boul. Laurier
Ste-Foy (Québec), Canada G1V 4G2
Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2715.
E-mail: martin.olivier@crchul.ulaval.ca

Key words: Chemokines, *Leishmania*, macrophage, phosphotyrosine phosphatases, SHP-1.

Abbreviations: bpV(phen), $K_2VO(V_2)_2phen \cdot 3H_2O$; tyr, tyrosine; PTKs, protein tyrosine kinases; PTPs, protein tyrosine phosphatases; LPS, lipopolysaccharide; Lm, *Leishmania major*; me, SHP-1-deficient macrophages; LMme, normal littermate macrophages.

ABSTRACT

To date, the role that phosphotyrosine phosphatases (PTPs) play with respect to chemokine production has not been thoroughly investigated. We used bpV(phen), a PTP inhibitor, to determine whether these phosphatases are involved in the regulation of chemokine expression by B10R murine macrophages. We show that bpV(phen) could induce *per se* the expression of many chemokine genes including RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1. Our results indicated that bpV(phen) treatment increased the mRNA levels of these chemokines in lipopolysaccharide-stimulated macrophages whereas it had no effect in *Leishmania major*-infected macrophages. Moreover, using SHP-1-deficient macrophages (me), we noted a greater induction of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2 and TCA-3 expression when compared to littermate macrophages (LMme). In these experiments, MIP-2 was markedly upregulated at the mRNA and protein levels. These results show that PTPs, in particular SHP-1, act as negative regulators in the signaling pathway that leads to the expression of the genes of chemokine, such as MIP-2. The fact that SHP-1-deficient mice develop severe autoimmune and immunodeficient diseases accompanied by enhanced cell infiltration indicates that this PTP must play an important role in the maintenance of normal chemokine-modulated inflammatory events. A better understanding on how PTPs act on the signaling pathways that regulate chemokine expression should conduct to the development of new strategies to control abnormal inflammatory-related pathologies.

INTRODUCTION

Chemokines encompass a superfamily of low molecular weight proteins that are important mediators of the multicomponent lesions resulting from inflammatory responses. Chemokines are multifunctional and have been shown to modulate diverse biological functions such as chemotaxis, endothelial cell adhesion, cell proliferation, effector cell functions and angiogenesis (1). It is thought that these activities underlie the important role played by chemokines early in the development of many diseases such as inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases and asthma (2-5). Therefore, elucidating the mechanisms regulating chemokine expression will certainly advance the search for new treatments of inflammatory diseases.

Phosphorylation of protein on their tyrosyl (tyr) residues represents an essential control mechanism for many signal transduction pathways regulating numerous physiological processes such as cell growth, differentiation, metabolism, and development (6-8). Control of tyr phosphorylation is the net result of the opposing effects of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) (6-8). Thus, the important role of counteracting substrate phosphorylation by the PTKs is played by PTPs maintaining cell homeostasis (6). Some reports (9-14) have demonstrated that PTPs can positively or negatively regulate cellular signaling. Recently, peroxovanadium compounds have been reported as a novel class of PTP inhibitors (15, 16). Each of these compounds contains an oxo ligand, one or two peroxo anions in the inner sphere of the vanadium atom, and an ancillary ligand. Peroxovanadium compounds act as insulinomimetic agents, as they activate insulin receptor kinases and mimic insulin biological actions, *in vivo* (15). Furthermore, they can trigger immune cell functions (17). As reported in *in vitro* and *in vivo* studies, these agents were shown to inhibit PTPs activities specifically, and represent the most potent PTP inhibitors known to date.

Over the last few years, SHP-1, an abundant PTP, which is expressed predominantly by hematopoietic cells, has been recognized for its role as a negative regulator of diverse growth factor, cytokine and signaling pathways (9-12, 18). Mice harboring a mutation in the SHP-1 gene have been named motheaten (me/me) and known to manifest autoimmunity traits and develop severe inflammatory disorders accompanied by polymorphonuclear and mononuclear cells infiltration in diverse subcutaneous tissues (19). These observations strongly suggest that PTP could have an important role to play in the regulation of chemokine gene expression.

To evaluate this hypothesis, we investigated the direct effect of the peroxovanadium compound bpV(phen) (16) on the regulation of the expression of chemokine genes in macrophages. In addition, to specifically examine the role of SHP-1 in the regulation of the expression of these pro-inflammatory molecules, immortalized bone marrow-derived macrophages generated from SHP-1-deficient motheaten mice and their normal littermates were analysed under basal conditions and following stimulation with known chemokine gene inducers.

Materials and Methods

Cell Culture: The murine bone marrow-derived macrophages B10R (20) was kindly donated by Dr. Danuta Radzioch (Mc Gill University, Montreal, QC, Canada). The bone marrow-derived macrophages derived from 6 week old SHP-1-deficient motheaten (me) and control mice (LMme) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), 5% penicillium-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY) and 5% L-glutamine (Gibco BRL, Grand Island, NY), at 37°C and 5% CO₂.

Parasites: *Leishmania major* promastigotes were grown at room temperature in SDM-79 culture medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) as previously described (21). Parasites were maintained by bi-weekly transfers.

Reagents: Lipopolysaccharide (LPS) (*E.coli*, serotype 0111:B4) was purchased from SIGMA (St-Louis, MO). Peroxovanadium compound K(VO(V₂)₂ phen.3H₂O [bpV(phen)], a PTP inhibitor, was kindly provided by Dr. B.I Posner (McGill University, Montréal, QC, Canada) and synthesized as previously described (16).

Chemokine mRNA expression: RNase protection assays were performed using an RNase protection assay kit (Riboquant, Pharmingen, San Diego, CA). Total RNA was isolated from cells with Trizol reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY) according to the manufacturer's protocol. RNA was subjected to the multiprobe mCK-5 which contains templates for the chemokines lymphotactin, eotaxin, RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10, MCP-1 and TCA-3, and the housekeeping genes mL32 and GAPDH. Briefly, the multiprobe was labeled with [α^{32} -P]-UTP using T7 polymerase. Ten μ g of total RNA was hybridized with 3×10^5 cpm of labeled probe for a 16 h period at 56°C. mRNA probe

hybrids were further incubated with the RNase mixture and phenol-chloroform extracted. Protected hybrids were subjected to a 5% denaturing polyacrylamide sequencing gel prior to an overnight exposition at -80°C . Laser densitometry was performed using an Alpha Imager 2000, digital imaging and analysis systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

Enzyme immunoassays of murine MIP-2: Cells (5×10^5 cells/well) were placed into 24-wells plates in medium with the stimuli to be tested. After various time intervals, the culture media were collected, transferred to polypropylene tubes, and centrifuged for 5 min. Resulting cell supernatants were collected and MIP-2 level measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (Quantikine murine MIP-2 (MM200), R&D Systems, Minneapolis, MN). The detection limits of the enzyme immunoassay for MIP-2 was 1,5 pg/ml.

Results

Effect of bpV(phen) on chemokine gene expression

To determine whether bpV(phen) could induce chemokine gene expression, various concentrations of this PTPs inhibitor were added to B10R macrophages for 4 h. mRNA expression was measured by RNase protection assays. RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 mRNA levels increased in response to bpV(phen) (Fig.1A). MCP-1, MIP-2, MIP-1 α and RANTES were induced by the addition of bpv(phen) in a dose-dependent manner whereas IP-10 and MIP-1 β were expressed at markedly lower concentrations (10 μ M). Thus, bpV(phen) used at 10 μ M seems to be the most effective dose for the induction of the expression of chemokine genes. In addition, we noted that their expression were differently modulated by bpV(phen) treatment suggesting that different types of PTPs may play specific roles in the regulation of various chemokines.

To determine the kinetics of chemokine gene expression following peroxovanadium compound treatment, B10R macrophages were incubated with 10 μ M bpV(phen) for increasing time intervals. Total RNA was extracted from macrophages at various time-points and subjected to RNase protection assay. There was a transient induction of MIP-1 α , MIP-2, IP-10, and MCP-1 mRNA, reaching maximum levels at 4 h and rapidly declining afterward (Fig.1B), whereas for MIP-1 β , the optimal expression was achieved at 8h post-treatment. On the other hand, the expression of RANTES mRNA increased in a time-dependent manner over 24 h (Fig.1B). Thus, conditions for the induction of chemokine expression in response to bpV(phen) vary with the different chemokines.

These results clearly showed that bpV(phen) had a stronger effect on some chemokines than on others. Evaluation of mRNA expression by densitometry analysis (data not shown) demonstrated a greater induction of MIP-2>MIP-1 α >MCP-1 in presence of bpV(phen) and at lesser extent of MIP-1 β >RANTES>IP-10.

Effect of lipopolisaccharide and Leishmania major on chemokine gene expression

To evaluate whether *Leishmania major* (Lm) and *E. coli* lipopolysaccharide (LPS), two pathogenic agents known to induce chemokine gene expression in different cell lines (23, 24), could induce chemokine mRNA expression in B10R macrophages, increasing concentrations of Lm or LPS were added to cells for a 4 h period. RNase protection assays were then performed. Lm and LPS were both potent inducers of chemokine gene expression (Fig. 2A). LPS induced RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 mRNA expression in a dose-dependent manner. In contrast, the addition of Lm led to an enhanced expression of MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1 without any significant variation among the concentrations used. There was no induction of RANTES and IP-10 genes in response to Lm infection (Fig. 2A). Thus, LPS (100 ng/ml) and Lm (20:1 parasites to cell ratio) seem to be effective for the induction of the expression of diverse chemokine genes.

To determine the kinetics of chemokine transcript expression in response to LPS and Lm treatment, B10R macrophages were cultured in their presence or absence for increasing periods of time. At each time point, total RNA was isolated and analyzed by RNase protection assay. LPS induced the expression of MIP-1 α/β and MIP-2 in a time-dependent manner, where maximal gene expression level was reached at 4 h post-treatment (Fig. 2B). On the contrary, Lm infection provoked a rapid and transient expression of these chemokines reaching optimal level 1-2 h post-infection and then, dropped off rapidly (Fig.2B). Moreover, the expression of RANTES, IP-10 (both expressed only in response to LPS) and MCP-1 were also maximum at 2 h and slightly declined thereafter (Fig.2B). Although, LPS and Lm can both induce chemokine gene expression efficiently, our data suggest that they may trigger different signaling pathways. Indeed, Lm seems to act more rapidly than LPS, which led to a late maximum expression of these chemoattractant agents.

Effect of bpV(Phen) on LPS- and Leishmania-induced expression of chemokine mRNAs.

To determine whether bpV(phen) modulates the induction of chemokine gene expression by LPS and Lm, B10R macrophages were incubated for 1 h with or without bpV(phen) prior to the addition of LPS or Lm. RNase protection assay was performed on total RNA, extracted 3 h post-stimulation. As previously reported in Figure 1, bpV(phen) treatment induced the expression of chemokines, but of interest the addition of this PTP inhibitor prior to LPS treatment led to a greater expression of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 compared to LPS alone (Fig. 3). The greatest effect was observed for MIP-2 with a 3.3-fold increase over its respective control. In contrast, addition of bpV(phen) to macrophage in culture prior to Lm infection led to an increase (almost 5-fold) in the gene expression of only one chemokine, IP-10. Indeed, other chemokines (MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1) expressed in response to Lm were partially inhibited by adding bpV(phen) (Fig.3). The expression of MCP-1 and MIP-1 α/β induced by Lm was reduced by approximately 15-28% in presence of bpV(phen), which had no effect on MIP-2 expression. Thus, inhibition of PTPs by bpV(phen) seems to up-regulate LPS-induced chemokine gene expression, in particular MIP-2, suggesting an important role for PTPs to control excessive chemokine activation in response to endotoxin. On the other hand, our data interestingly revealed that the signaling pathways utilized by Lm to trigger chemokine gene expression does not involve or minimally necessitate the participation of PTPs to regulate their expression. This last observation even suggests that Lm-mediated PTPs activation could be necessary at some point for the induction of some of these chemokines (i.e. MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1).

Effect of SHP-1 on chemokine gene expression

Two newly developed macrophage cell lines (Forget et al., unpublished) were used to investigate whether SHP-1, a PTP recognized as a major negative regulator of cellular signaling, could be involved in the regulation of chemokine gene expression. Me

macrophages were derived from SHP-1 deficient motheaten mice and LMme macrophages were derived from normal wild-type control mice (18). The two cell lines were incubated over a 4 h period with and without LPS or Lm promastigotes. RNase protection assay was performed on total RNA. In both cell lines, LPS and Lm were potent inducers of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, and MCP-1 (Fig.4). In LMme macrophages, we noted a rapid and transient expression of MIP-1 β and MIP-2 that reached a maximum level at 1-2 h post-stimulation with LPS, before declining (Fig. 4). On the other hand, RANTES and IP-10 showed a time-dependent induction (Fig. 4). There was no significant induction of MIP-1 α and MCP-1 (Fig. 4). Infection of cells with Lm induced a rapid and transient expression of MIP-2, maximum 1 h post-infection. RANTES, MIP-1 α/β , IP-10, and MCP-1 were not expressed in Lm-infected macrophages (Fig.4). As in LMme macrophages, a similar profile of chemokines was induced in response to LPS and Lm in me macrophages. As shown in Fig.4, LPS led to a time-dependent expression of RANTES, MIP-1 β , MIP-2, MCP-1 and TCA-3, reaching a maximum after 4 h. On the contrary, me macrophages infected with Lm expressed RANTES and MIP-2 with optimal expression after 1 h then diminished rapidly (Fig.4). The expression of MIP-1 α/β and MCP-1 in response to Lm in me macrophages was also time-dependent. The expression of IP-10 was observed only in LMme macrophages stimulated with LPS and Lm whereas LPS-induced expression of TCA-3 was observed in me macrophages but absent from LMme macrophages. As shown in Fig. 4, LPS was differentially inducing chemokines as reflected by the absence of IP-10 and TCA-3 expression in Lm-infected macrophages.

Thus, adding either LPS or Lm induced chemokine expression in both cell SHP-1-deficient and control cell lines. However, our results further indicated that me macrophages had a stronger basal expression of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, and MCP-1 mRNAs in comparison to LMme macrophages (Fig. 4, densitometry analysis). We observed an almost 2-fold difference in this basal expression for RANTES, MIP-1 β and MCP-1, but the strongest observed was the 3-fold difference for MIP-2. Therefore, SHP-1

seems to play a pivotal role in the negative signaling regulation of several chemokines, but of most of importance for MIP-2 expression.

Role of SHP-1 in the regulation of MIP-2 protein secretion

To correlate results from MIP-2 gene expression analysis of me macrophages in comparison to LMme macrophages, secretion of MIP-2 in response to LPS and Lm was monitored by ELISA. Supernatants of macrophage cultures subjected to LPS and Lm infection contained increasing amounts of MIP-2, which were maximal after 4 h (Fig.5). At the basal level, supernatants from me macrophages contained a greater amount (3-fold) of MIP-2 protein compared to supernatants from LMme macrophages. LPS-stimulated me macrophages as well as Lm-infected me macrophages released a greater amount (2.4-fold) of MIP-2 protein in their culture media than that of LPS/Lm-stimulated LMme macrophages (Fig.5). Thus, these results revealed that in absence of SHP-1 the agonist-stimulated MIP-2 protein secretion by macrophages is exacerbated confirming the observation reported for MIP-2 gene expression. These data strengthen the concept that the macrophage PTP SHP-1 plays a pivotal role in the negative regulation of the expression of several chemokines permitting to limit their secretion in response to different agonists.

Discussion

Chemokines play a fundamental role in the pathogenesis of inflammatory processes by inducing chemotaxis of specific cell populations, both *in vitro* and *in vivo* (1). Therefore, the production of these inflammatory mediators must be regulated to control inflammation. Mechanisms for many signal transduction pathways of immune cell functions are directly regulated, negatively or positively, by some PTPs by dephosphorylation of specific tyr residues (9-14). PTP inhibitors (i.e. peroxovanadium) have been used extensively to modulate different cellular processes in various *in vitro* and *in vivo* systems (25). These compounds have been shown to be good activators of immune cell functions (17,29). In the present study, we obtained strong evidence that PTPs, in particular the PTP SHP-1, play a pivotal role in the regulation of the basal level of expression of chemokine genes or in the context of cellular activation.

We report that modulation of host PTPs by bpV(phen) was effective in inducing the expression of the genes of the chemokine RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 in B10R murine macrophages. However, its action varied according to each chemokine, demonstrating a more potent effect on specific chemokines. Indeed, RNase protection assays have shown a greater induction of MIP-2 > MIP-1 α > MCP-1 by adding bpV(phen) compared to MIP-1 β > RANTES > IP-10. Thus, our results seem to designate PTPs as important negative regulators of the signaling process implicated in the production of chemokines when they are activated. This is consistent with several studies where PTPs negatively regulate many cellular signaling such as those mediated by the B-cell receptor (BCR) (9) and erythropoietin receptor (10). We found that production of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 and MCP-1 in response to bpV(phen)/LPS-treatment in B10R macrophages was increased compared to LPS alone. More specifically, MIP-2 was the chemokine whose expression was the most affected by the addition of bpV(phen) (3.4 fold increase). Therefore, the expression of chemokines induced by LPS is modulated

by bpV(phen) treatment, especially MIP-2, suggesting an important participation of PTPs in this process. On the other hand, Lm-induced chemokine expression was slightly or not affected by bpV(phen). We did not observe an upregulation of MCP-1, MIP-2 and MIP-1 α/β expression. While we found a reduction of approximately 15-28% of MIP-1 α/β and MCP-1 expression, there was no significant effect on MIP-2 production. Although, the difference in the modes of production of chemokines in LPS-stimulated and Lm-infected macrophages following bpV(phen) addition has not yet been explained, we proposed that these two potent inducers of chemokine production involve two different signaling pathways. In fact, it is well documented that LPS binds mainly to the macrophage surface receptors CD14 (26) and CD11b/CD18 (27), whereas Lm can bind to a variety of macrophage receptors including mannose/fucose receptor, CR1, CR3, advanced glycosylation end-product receptor, and fibronectin receptor (28). Ligation of a specific receptor by LPS might lead to a specific signal transduction pathway in which PTPs act as major negative regulators, particularly in the chemokine induction process. Unlike LPS, binding of Lm to another specific macrophage receptors might activate a cascade of signaling events implicating a different subset of PTPs. Indeed, *Leishmania* was recognized to promote alteration of PTK-dependent signaling in *L. donovani*-infected macrophages by upregulating PTP activities (29) which may be involved in the regulation of specific cellular signaling pathway such as the generation of nitric oxide by macrophages (29). Thus, inhibition of PTP by bpV(phen) in presence of Lm might lead to the partial reduction of the production of MCP-1 and MIP-1 α/β chemokines observed. However, specific experiments must be performed to support this hypothesis.

As our results showed evidence for an important negative regulation by PTPs on chemokine gene expression, we investigated the involvement of SHP-1 in this process. SHP-1 is expressed at high levels in hematopoietic cells (6). Many reports (9-12) have identified this PTP as an important negative regulator of many cellular signaling in immune cells. Indeed, dephosphorylation of specific substrates by SHP-1 led to the

inhibition of signaling induced by the ligation of BCR, erythropoietin receptor, c-kit receptor and colony-stimulating factor-1 receptor. Motheaten (me/me) mice possess inactivating mutations in the gene encoding SHP-1 causing the expression of functionally deficient SHP-1 protein (19). This is associated with early severe autoimmune and immunodeficiency disease, resulting from abnormal expansion and inappropriate activation of macrophages and granulocytes (30). Bone marrow-derived macrophages (me) from motheaten mice have been tremendously valuable in the search for the function and importance of SHP-1. Expression of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1 chemokines was induced in macrophages derived from normal littermate mice (LMme) as well as in me macrophages in response to LPS and Lm stimulation. Moreover, IP-10 induction seemed to require SHP-1 activities since its expression was observed only in LMme macrophages. On the contrary, TCA-3 expression was completely absent from these cells suggesting a specific negative regulation by SHP-1. We noted significant differences in the degree of chemokine expression according to each cell line. At basal level, without any stimulation, me macrophages expressed the mRNAs of RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2 and MCP-1 to a much higher extent than LMme macrophages. Interestingly, as demonstrated by bpV(phen) treatment in B10R macrophages, MIP-2 expression seemed to be more affected by SHP-1 deficiency than other chemokines with a greater than 3-fold increase in mRNA expression. Furthermore, the degree of induction of all chemokines in response to LPS or Lm was much higher in me macrophages compared to LMme macrophages. Thus, these results clearly show that PTPs act as negative regulators of cellular signaling that lead to chemokine production, especially via SHP-1 action. SHP-1 seemed to be more effective against MIP-2 production. The mRNA expression of this particular chemokine, in response to bpV(phen) treatment in B10R macrophages as well as in LPS or Lm-stimulated me macrophages, was the most induced. The enzyme immunoassays also revealed that MIP-2 protein was overall more released in the supernatants of me macrophages as compared to LMme supernatants. In fact, in the

absence of stimulation, me macrophages produced 3-fold more MIP-2 protein in comparison to LMme macrophages. Moreover, the overall production of MIP-2 in response to LPS and Lm reached higher amounts in me macrophages culture media (approximately 3 fold and 2.2 fold respectively) as compared to LMme macrophages.

Since, MIP-2 is recognized as an extremely potent chemotactic agent for neutrophils (31), many studies (32, 33) have reported its important involvement in the development of several inflammatory diseases, in particular rheumatoid arthritis, an autoimmune disease characterized by an important recruitment and activation of leukocytes within the synovial environment. It has been reported (33) that synovial fluid recovered from these patients has a potent neutrophil chemotactic activity and passive immunization with antibodies to MIP-2 resulted in a significant reduction of arthritis in mice. Thus, our results might have an important impact on therapy for autoimmune and immunodeficiency diseases similar to those found in SHP-1 deficient mice. The absence of SHP-1 activity in these mice might be responsible for this upregulation of specific chemokine gene expression resulting in an exacerbative inflammatory response. Targeting of MIP-2, either directly or indirectly through SHP-1, may prove to be a beneficial therapeutic approach to attenuating autoimmune and immunodeficiency diseases.

References

- 1- Baggiolini, M., Dewald B., Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines C-X-C and C-C chemokines. *Adv.Immunol.* **55**, 94-179.
- 2- Lukacs, N.W., Strieter R.M., Warmington K., Lincoln P., Chensue S.W., Kunkel S.L. (1997) Differential recruitment of leukocyte population and alteration of airway hyper-reactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J.Immunol.* **158**, 4398-4404.
- 3- Mazzucchellini, L., Hauser C., Zgraggar K., Wagner H.E., Hess M.W., Laissue J.A., Mueller C. (1996) Differential in situ expression of the gene encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel diseases. *J.Pathol.* **178**, 201-206.
- 4- Koch, A.E., Kunkel S.L., Harlow B. Johnson H.L., Evanoff H.L., Haines G.K., Burdick M.D., Strieter R.M. (1992) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.* **90**, 772-779.
- 5- Karpus, W.J., Lukacs N.W., Mc Rae B.L., Strieter R.M., Kunkel S.L., Miller S.D. (1995) An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T-cell mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* **155**, 5003-5010.
- 6- Mustelin, T., Brockdorff J., Gjorloff-Wingren A., Tailor P., Han S., Wang X., Saxena M. (1998) Lymphocyte activation: the coming of the protein tyrosine phosphatases. *Frontiers Biosci.* **3**, d1060-d1096.
- 7- Okumura, M., Thomas M.L. (1995) Regulation of immune functions by protein tyrosine phosphatases. *Curr.Opin. Immunol.* **7**, 312-319.
- 8- Tonks, N.K., Nell B.G. (1996) Form to function: signalling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **87**, 365-368.
- 9- Pani, G., Kozlowski M., Cambier J.C., Mills G.B., Siminovitch K.A. (1995) Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signalling. *J.Exp.Med.* **181**, 2077-2084.

- 10- Klingmueller, U., Lorenz U., Cantley L.C., Neel B.G., Lodish H.F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-738.
- 11- Kozlowski, M., Larose L., Lee F., Le D.M., Rottapel R., Siminovitch K.A. (1998) SHP-1 binds and negatively modulates the c-kit receptor. *Mol.Cell.Biol.* **18**, 2089-2099.
- 12- Chen. HE., Chang S., Trub T. Neel B.G. (1996) Regulation of CSF-1 receptor signalling by SH2 domain-containing SHPTP1. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 3685-3697.
- 13- Bennett, A.M., Tang T.L., Sugimoto S., Walsh C.T., Neel B.G. (1994) Protein-tyrosine phosphatase SHPT2 couples platelet-derived growth factor receptor to Ras. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 7335-7339.
- 14- Frearson, J.A., Alexander D.R. (1998) The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T-cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkatt T cells. *J.Exp.Med.* **187**, 1417-1426.
- 15- Bevan, A.P., Burgess J.W., Yall J.-F., Drake P.G., Lachance D., Baquiran G., Shaver A., Posner B.I. (1995) In vivo insulin mimetic effects of peroxovanadium compounds: role for tissue targeting. *Am.J.Pathol.Physiol.* **268**, E60-E66.
- 16- Posner, B.I., Faure R., Bergeron J.W., Bevan A.P., Lachance D., Zhang-Sun G., Ng J.B., Hall D.A., Lum B.S., Shaver A. (1994) Peroxovanadium compounds, a new class of potent protein tyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J.Biol.Chem.* **269**, 4596-4604.
- 17- Barbeau, B., Bernier R., Dumais N., Briand G., Olivier M., Faure R., Posner B.I., Tremblay M. (1997) Activation of HIV long terminal repeat transcription and virus replication via NFkB-dependent and -independent pathways by potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors, the peroxovanadium compounds. *J.Biol.Chem.* **272**, 12968-12977.
- 18- Neel, B.G. (1997) Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 405-420.

- 19- Kozlowski, M., Mlinaric-Rascan I., Feng G.-S., Shen R., Pawson T., Siminovitch K.A. (1993) Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J.Exp.Med.* **178**, 2157-2163.
- 20- Radzioch, D., Hudson T., Boule M., Barrera L., Urbance J.W., Varesio L., Skamene E. (1991) Genetic resistance/susceptibility to Mycobacteria: phenotypic expression in bone marrow derived macrophage lines. *J.Leuk.Biol.* **50**, 263-272.
- 21- Olivier, M. and C.E. Tanner. (1987) Sensibility of macrophage population to injection *in vitro* by *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **55**,467-71.
- 22- Kasama, T. R.M. Strieter, T.J. Standiford, M.D. Burdick and S.L. Kunkel. (1993) Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein-1. *J. Exp. Med.* **178**, 63-72.
- 23- Badolato, R., D.L. Sacks, D. Savoia and T. Musso. (1996) *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* **82**, 21-6.
- 24- Racoosin, E.L. and S.M. Beverley. (1997) *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* **85**, 283-95.
- 25- Tsiani, E., Fantus I.G. (1997) Vanadium compounds: Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol.Metab.* **8**, 51-58.
- 26- Wright, S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding proteins. *Science* **249**, 1431-1433.
- 27- Ingalls, R.R. and D.T. Golenbock. (1995) CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolisaccharide. *J. Exp. Med.* **181**, 1473-1479.
- 28- Reiner, S.L., Locksley R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu.Rev.Immunol.* **13**, 151-177.

- 29- Olivier, M., Romero-Gallo B.-J., Matte C., Blanchette J., Posner B.I., Tremblay M.J., Olivier M. (1998) Modulation of interferon- γ -induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition, Effect on murine leishmaniasis progression. *J.Biol.Chem.* **273**, 13944-13949.
- 30- Bignon, J.S., Siminovitch K.A. (1994) Identification of PTP1C mutation as a genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the role of protein tyrosine phosphatases in the regulation of hematopoietic cell differentiation and function. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **73**, 168-179.
- 31- Wolpe, S.D., Sherry B., Juers D., Davatelis G., Yurt R.W., Cerami A. (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 612-616.
- 32- Standiford, T.J., Kunkel S.L., Greenberger M.J., Laichalk L.L., Strieter R.M. (1996) Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J.Leukoc.Biol.* **59**, 24-28.
- 33- Kunkel, S.L., Lukacs N., Kasama T., Strieter R.M. (1996) The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J.Leukoc.Biol.* **58**, 6-12.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Effect of bpV(phen) on chemokine mRNA expression in murine B10R macrophages. (A) Cells were incubated for 2 h with or without various concentrations of bpV(phen) (1-50 μ M). Total RNA was isolated and analyzed by RNase protection. (B) Kinetic expression of chemokine genes in murine B10R macrophages. Cells were incubated for increasing period of time (1-4 h) with or without bpV(phen) at 10 μ M. Following extraction of total RNA, RNase protection assay was performed. Free RNA probe is shown in the far left lane. The fold increase was calculated from the densitometry of the autoradiogram.

Figure 2 Effect of LPS and *Leishmania major* on induction of chemokine expression in murine B10R macrophages. (A) Cells were stimulated with or without various concentrations of LPS (10-1000 ng/ml) or *Leishmania major* (Lm) (5 to 20:1, parasites to cell ratio) for a 4 h period. Total RNA was analyzed by RNase protection assays following its isolation. (B) Cells were treated over a 4 h period with LPS or Lm as above. Total RNA was isolated prior to RNase protection analysis. Free RNA probe is in the far left lane. Increases in expression were evaluated by densitometric analysis of the autoradiogram.

Figure 3 Effect of bpV(phen) on chemokine gene expression in LPS-stimulated or Lm-infected murine B10R macrophages. Cells were treated with bpV(phen) (10 μ M; 1h) prior to addition of LPS or Lm for a 3 h period as described in Figure 2. RNase protection assay was performed following extraction of total RNA. The free RNA probe appears in the first lane. The increase was evaluated by densitometric analysis of the autoradiogram.

Figure 4 Effect of LPS and Lm on the induction of chemokine mRNA expression from murine control LMme macrophages and SHP-1-deficient me macrophages. Cells were exposed to LPS or Lm for an increasing time intervals (1-4 h). Total RNA was isolated and further analyzed by RNase protection. The first lane contains the free RNA probe. The increase was evaluated by densitometric analysis of the autoradiogram.

Figure 5 Agonist-induced macrophage MIP-2 production in absence of SHP-1. Cells were incubated with LPS or Lm over a 8 h period. At each time-point, the amount of MIP-2 secreted into the culture media was determined by enzyme immunoassays as described in Materials and Methods. Each value is expressed as the mean \pm S.D. of data from triplicate of two separate experiments.

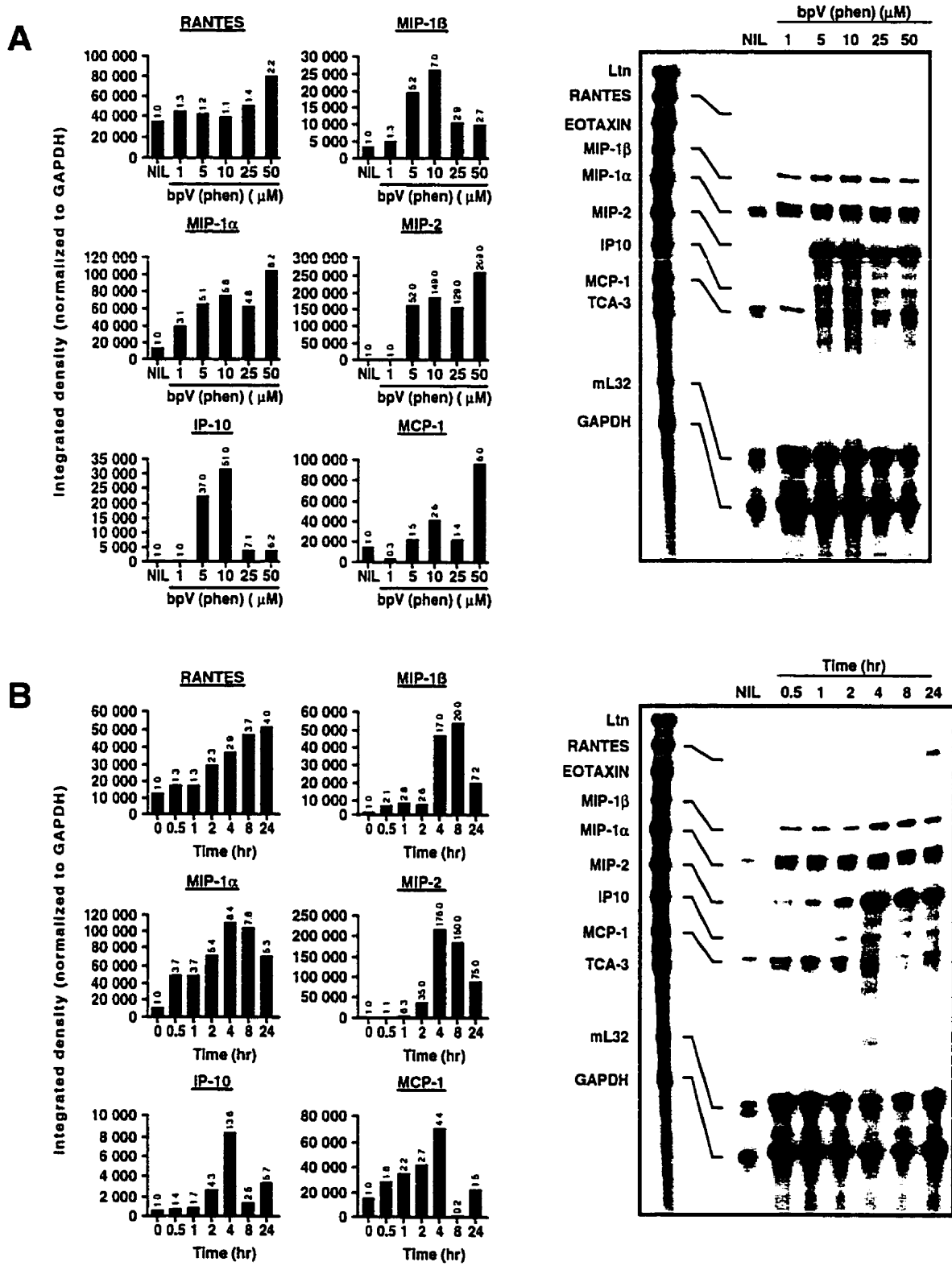


Figure 1

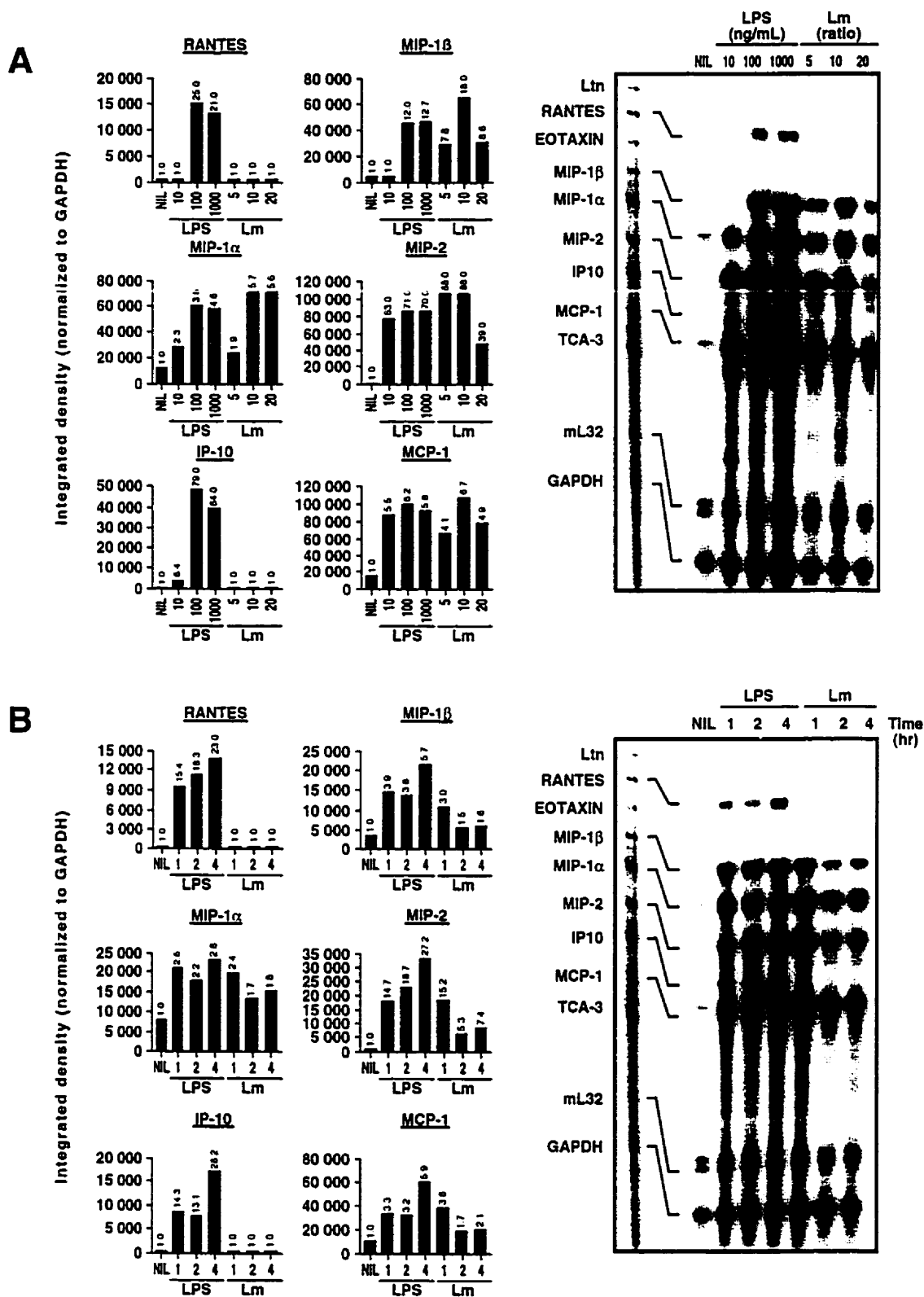


Figure 2

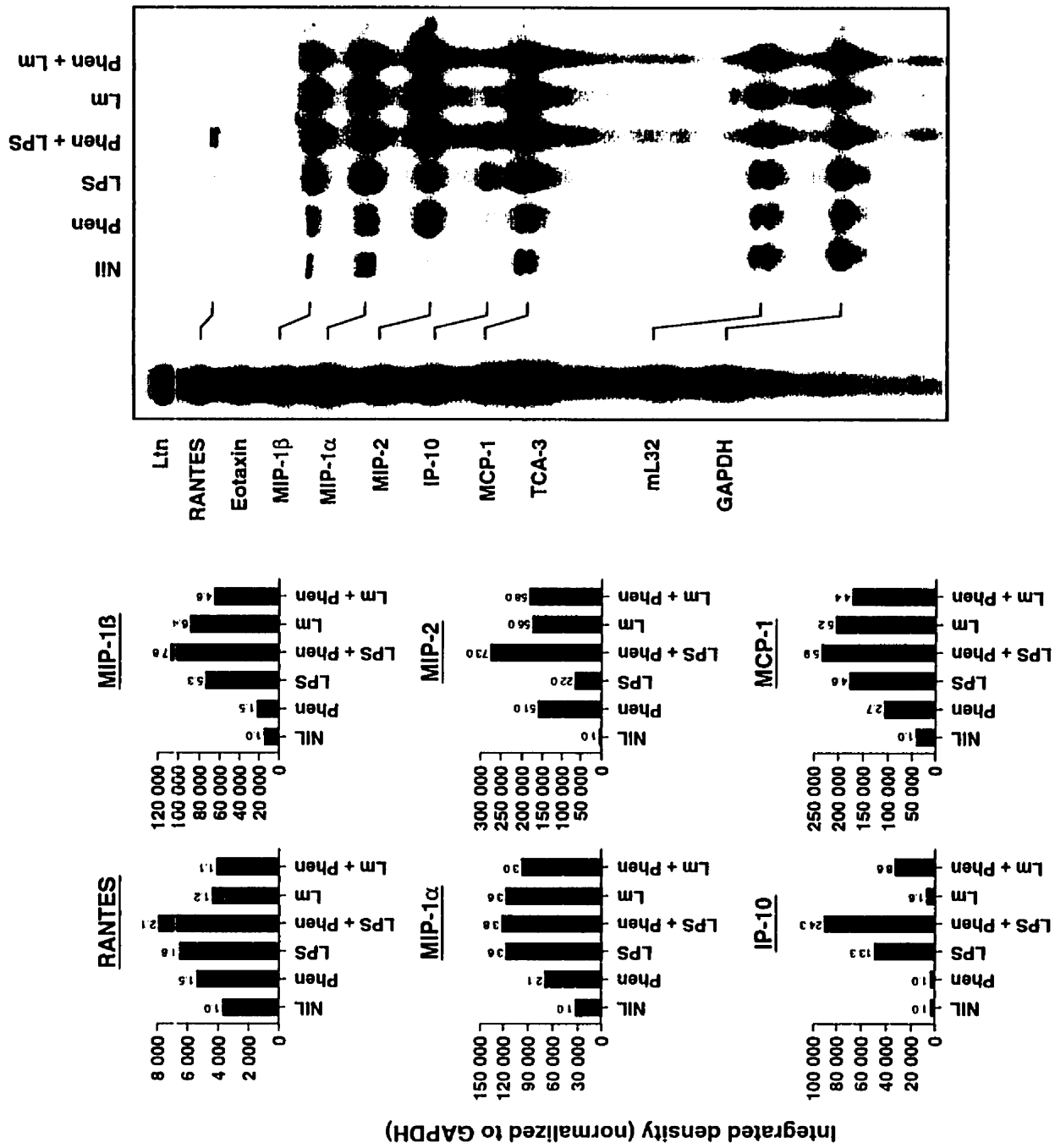


Figure 3

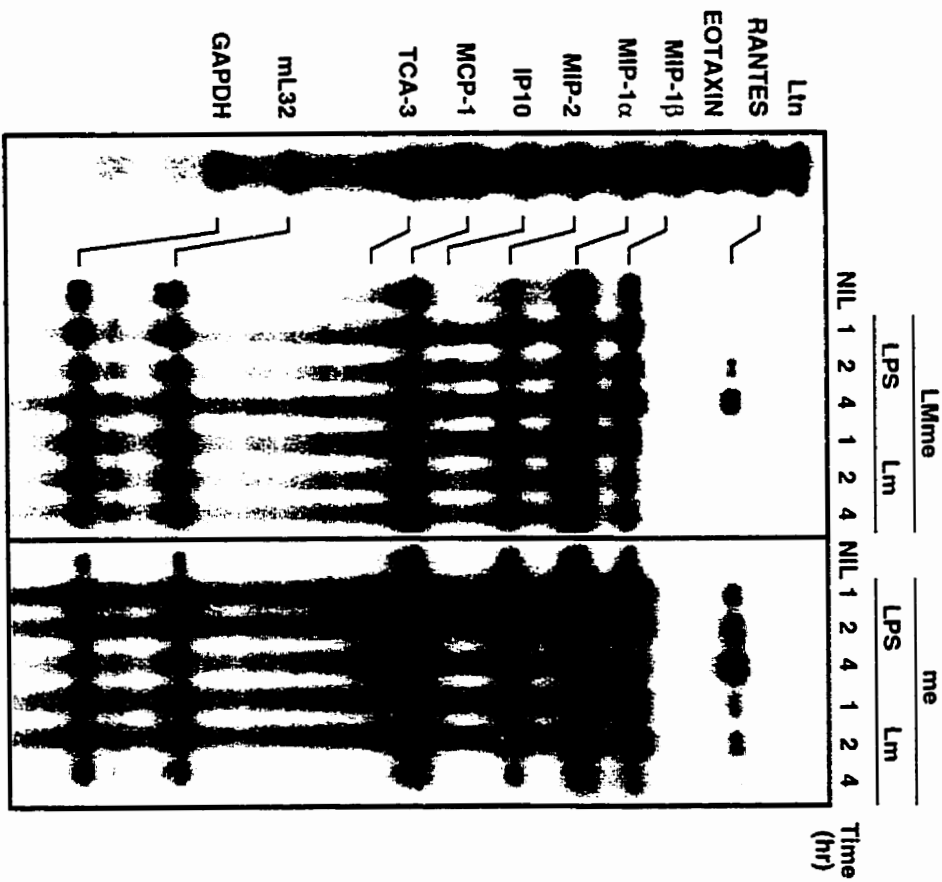
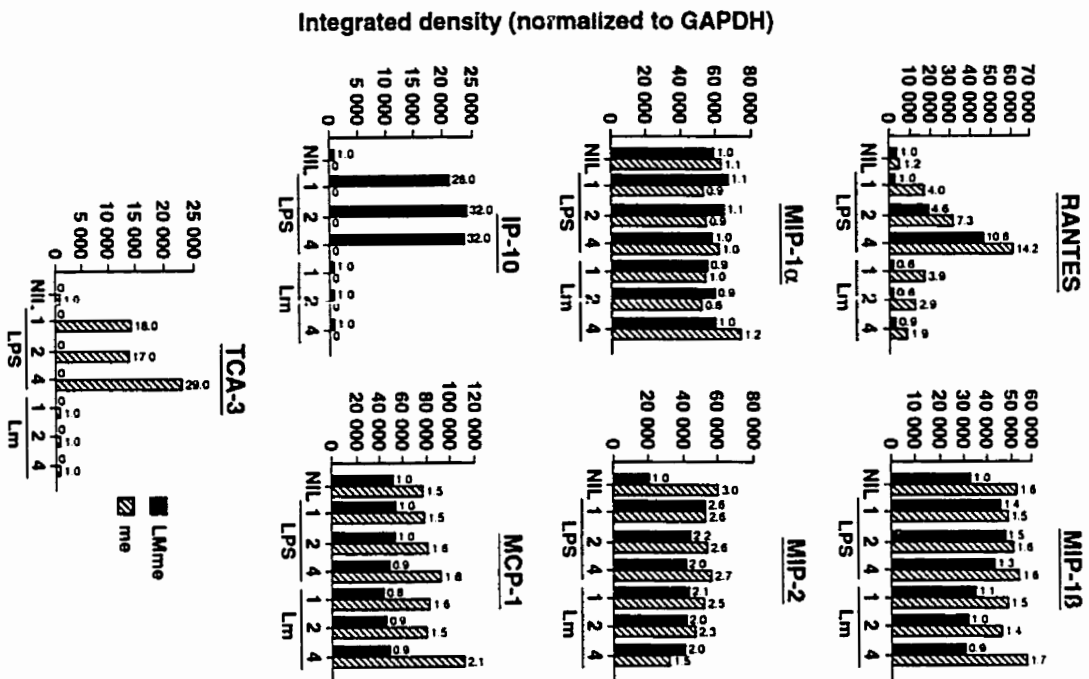


Figure 4

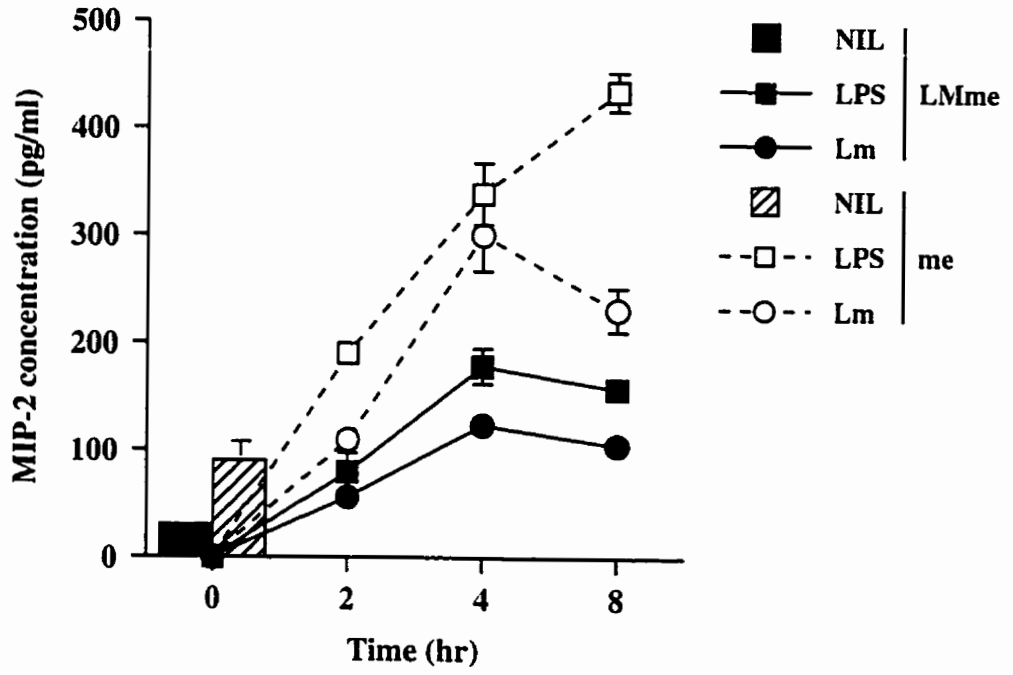


Figure 5

Table 1.: Fold increase in mRNA expression at basal level, a comparison between LMme and me macrophages

	<u>LMme macrophages</u>	<u>me macrophages</u>	Fold increase
MCP-1	51870	94608	1.8
MIP-2	16770	60264	3.6
MIP-1 α	83417	88776	1.1
MIP-1 β	32760	52488	1.6
RANTES	4160	7448	1.8

CHAPITRE 5**L'EXPRESSION DE LA CYCLOOXYGÉNASE (COX-2) INDUITE PAR LES
MITOGÈNES CHEZ LES MACROPHAGES INFECTÉS PAR LE *LEISHMANIA*
*DONOVANI***

5.1 RÉSUMÉ

La sécrétion de la prostaglandine E₂ (PGE₂) lors de l'infection à *Leishmania* a été rapportée. Le mécanisme par lequel la production de la PGE₂ est induite suivant l'infection à *Leishmania* n'est pas bien déterminé. La cyclooxygénase-2 (COX-2) et la phospholipase cytosolique A₂ (PLA_{2c}) sont potentiellement impliquées dans la synthèse de la PGE₂ en réponse à une variété de stimuli. En conséquence, l'implication de ces enzymes a été évaluée dans une lignée cellulaire monocytaire humaine U937 infectée par le *Leishmania*. Les expériences de cinétique montrent une augmentation significative de la synthèse de la PGE₂ résultant de l'expression de l'ARNm et de la protéine COX-2 lorsque les cellules U937 sont incubées en présence de LPS ou du *Leishmania donovani*. L'indométhacine (un inhibiteur de l'enzyme COX-2), la génistéine (un inhibiteur de protéines tyrosines kinases (PTKs)) et le H7 (un inhibiteur de la protéine kinase C) inhibent la production de la PGE₂ chez les cellules infectées par le *Leishmania donovani* ou stimulées par le LPS. Toutefois, seul le H7 inhibe la hausse de l'ARNm de la COX-2, et il y a une corrélation significative entre l'inhibition de la PGE₂ et l'ARNm de la COX-2. Nos résultats indiquent que l'infection des cellules U937 par le *Leishmania donovani* mène à l'activation de la COX-2 qui médie la production de la PGE₂. Cette réponse est dépendante de la PKC. Une meilleure compréhension du mécanisme par lequel le *Leishmania* peut induire la production de la PGE₂, pourrait fournir des indications concernant la pathophysiologie de l'infection à *Leishmania* et pourrait être pertinente pour l'élaboration d'une nouvelle approche thérapeutique.

RUNNING TITLE:

CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN *LEISHMANIA*-INFECTED CELLS

**EXPRESSION OF MITOGEN-INDUCIBLE CYCLOOXYGENASE (COX-2) IN
LEISHMANIA DONOVANI-INFECTED MACROPHAGES**

Claudine Matte^{1¶}, Grazia Maion^{1¶}, Walid Mourad² and Martin Olivier^{1*}

Centres de Recherche en Infectiologie¹ et de Rhumatologie et Immunologie² du CHUL,
Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada.

* Correspondence to: Martin Olivier, Ph.D.
Centre de Recherche du C.H.U.L.
2705, Boul. Laurier, Ste-Foy
(Québec), Canada G1V 4G2.
E-mail: martin.olivier@crchul.ulaval.ca

¶ Contributed equally to this work.

Key words: Cyclooxygenase; intracellular parasitism; macrophage; *Leishmania*; LPS; PGE₂.

ABSTRACT

Secretion of prostaglandin E₂ (PGE₂) during the course of *Leishmania* infection has been reported. The signaling mechanisms that induce PGE₂ production following *Leishmania* infection are not well understood. Since cyclooxygenase-2 (COX-2) and cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) are potentially involved in PGE₂ synthesis in response to various stimuli, the implication of these enzymes was evaluated in the *Leishmania*-infected PMA-differentiated U937 human monocytic cell line. Time-course experiments showed that PGE₂ synthesis increased significantly in parallel with COX-2 mRNA and protein expression when U937 cells were incubated in the presence of *Leishmania donovani* promastigotes or LPS. Indomethacin, genistein, and H7, which are, respectively, inhibitors of COX-2, protein tyrosine kinase (PTK) and protein kinase C (PKC), inhibited PGE₂ production of both *Leishmania donovani*-infected cells and those stimulated by LPS. However, only H7 inhibited increased mRNA synthesis of COX-2, and there was a significant correlation between inhibition of PGE₂ and COX-2 mRNA synthesis. Overall, our results indicate that infection of U937 by *Leishmania donovani* leads to the activation of COX-2 and generation of PGE₂ in part through a PKC-dependent signaling pathway. They further reveal that PTK-dependent events are necessary for *Leishmania*-induced PGE₂ generation, but not COX-2 expression. A better understanding of the mechanisms by which *Leishmania* can induce PGE₂ production could provide insight into the pathophysiology of *Leishmania* infection and may help improve the design of better therapeutic approaches.

INTRODUCTION

The parasite of the genus *Leishmania* is responsible for various pathologies affecting over 15 million of individuals worldwide, that will develop following its vector-mediated transmission encompassing cutaneous, muco-cutaneous and the deadly visceral leishmaniasis (Kala Azar) (3). Successful infection of macrophages by *Leishmania* is dependent upon a variety of mechanisms that make possible the survival of this parasite in the harsh environment of those phagocytic cells (6, 26, 27, 29, 30, 39). The inability of the host to develop an effective immune response during the infection is a hallmark of the parasitic infection and may involve the participation of the immunosuppressive molecule PGE₂ (2, 5, 11, 35). Tissue macrophages play a crucial role in the initiation and regulation of the inflammatory response via their capacity to elaborate biological mediators such as cytokines, growth factors and bioactive lipids (40).

Macrophages are a major source of prostanoids during inflammation. Prostaglandins are among the best-studied mediators produced by macrophages and are products of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid and include thromboxane A₂, PGE₂, and PGI₂ (40). The conversion of arachidonic acid to PGE₂ is catalyzed by the enzyme cyclooxygenase (COX), which exists as two isoforms. COX-1 is constitutively expressed whereas COX-2 is highly inducible in response to phorbol esters, LPS and interleukin-1 in competent cells such as endothelial cells, fibroblasts and macrophages (2, 33). Exogenous PGE₂ inhibits macrophage proliferation, oxygen radical generation, accumulation of LPS-induced TNF- α mRNA and cellular release of, as well as cellular responses to, various proinflammatory mediators and growth factors, thus resulting in the downregulation of inflammation, immune function and fibrogenesis (5). Furthermore, parasite-derived PGE₂ may affect the severity of infection by favoring an exacerbating Th2-cell response (11). Notably, previous studies have reported increased PGE₂ production during the course of *Leishmania* infection initiated *in vitro* and *in vivo* which may favor its progression (11, 35).

In the present study, we were interested to establish the signaling pathways that are involved in the induction of PGE₂ production following *Leishmania*/macrophage interaction. A more complete knowledge of the biochemical cascades leading to this inflammatory mediator may speed up the development of new anti-inflammatory molecules aimed at the ultimate reduction of the immunosuppressive state of the infected host.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Anti-COX-2 antibody was a generous gift from Dr. K. Neilson. Lipopolysaccharide (serotype *E. coli* 0111:B4), PGE₂, phorbol myristate acetate (PMA) and indomethacin, were purchased from Sigma (Canada); Genistein and H7 was purchased from BioMol (USA). The 1.8-kb ECOR I-Apa I fragment of human COX-2 (18), and the 2.2-kb Bgl II/Hind III fragment of human cytosolic PLA₂ (cPLA₂) prepared as described (1) were used as molecular probes. The cDNA probe for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (1.2-kb Pst I fragment; plasmid pBR322) was obtained from Dr. D. Radzioch (McGill University, Montréal, Canada). TRIzol and all culture reagents were from Gibco-BRL except for the fetal bovine serum used in the culture of U937 which was bought from Hyclone Laboratory Inc. (USA). ECL Western blotting detection reagents were from Amersham (Canada).

Cell and parasite cultures. Human monocytes (U-937, #ATCC CRL 1593) were maintained in supplemented DMEM containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 100 U per ml of penicillin and 100 µg per ml of streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a controlled humidified 95% air, 5% CO₂ incubator. *Leishmania donovani* (1S2D strain) promastigotes were grown in continuous culture at room temperature and transferred weekly in SDM-79 culture medium as previously described (28).

In vitro cell stimulation. Prostaglandin synthesis and expression of COX-2 mRNA and protein following stimulation by LPS or infection by *Leishmania* were evaluated in PMA-differentiated U937 cells. Briefly, U-937 were suspended at a final concentration of 10⁶ per ml in DMEM containing 10 ng/ml of PMA and were distributed in 24-well tissue culture plates or 25 cm² culture flasks (1 ml per well or 10 ml per flask). After 3 days of treatment with PMA, which allowed the monocytes to differentiate into a nondividing

adherent monolayer (23), supernatants were removed, cells washed twice with HBSS, and the remaining adherent cells were quiesced in fresh complete DMEM in the absence of PMA for 2 days before stimulation with LPS (100ng/ml) or *Leishmania* (20:1 parasite-to-cell ratio).

Measurement of prostaglandin E₂ by enzyme immunoassay. PGE₂ was quantified by solid-phase immunoassay in 96-well microtiter plates using acetylcholine esterase as tracer (34). Acetylcholine esterase activity was measured using the colorimetric method of Ellman with use of an automatic reader. Concentrations of PGE₂ were evaluated from a standard curve constructed from measured values of known concentrations of synthetic PGE₂ that had been added to the incubation medium. The detection limit of this assay was 2 pg/ml; cross-reactivities between PGE₂ and the other prostanoids were found to be lower than 0.01%.

Northern blot. Expression of COX-2 and cPLA₂ in U937 after stimulation by LPS or infection by *Leishmania* was evaluated by Northern blot of total mRNA, as described previously (31). Briefly, after incubation under appropriate conditions, cells were washed twice with HBSS, and total RNA extracted using TRIzol reagent. Ten to twenty micrograms of RNA were loaded onto a 1% agarose gel and subjected to electrophoresis. RNA was then transferred onto Hybond-N filter paper and hybridized with random primer labeled cDNA probes. Equal RNA loading was also confirmed by hybridization with a GAPDH cDNA probe. All washes were performed under stringent conditions. The mRNA hybridizing with the cDNA probe was visualized by autoradiography.

Western blot analysis. Cells were collected following stimulation, lysed in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl, 10% glycerol (v/v), 1% Nonidet P-40 (v/v), 25 μM nitrophenyl guanidinobenzoate, 10 mM NaF, 1 mM V, 25 μg/ml leupeptin

and aprotinin. The lysates (20 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were separated by SDS-PAGE and proteins transferred to a nitrocellulose membrane and blocked overnight as we previously described (31). Membranes were first incubated with anti-COX-2 antibody. After several washes in TBS-T, membranes were incubated with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG/IgM antibody (Affinipure, Jackson Immuno Research Laboratories, USA) diluted in TBS-T. After several washes with TBS-T, membranes were developed using ECL Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Canada).

RESULTS

Kinetics of PGE₂ production and COX-2 expression in *Leishmania*- and LPS-stimulated macrophages. Previous experiments have already demonstrated the induction of PGE₂ production following *Leishmania* infection (35), but nothing is known concerning its capacity to induce COX-2 mRNA expression. To optimize conditions for COX-2 mRNA expression in PMA-differentiated U937 macrophages stimulated by LPS and *Leishmania donovani* infection, time course and dose-response experiments were performed. Infection of PMA-differentiated U937 macrophages by LPS, used as a positive control, and the protozoan parasite *Leishmania donovani* showed a significant time-dependent increase in PGE₂ production (Fig. 1A) which slowed-down after 6 hours in the case of *Leishmania*-infected cells. Western blots showed a maximum increase of COX-2 protein after a 12 hours stimulation in response to LPS or to *Leishmania* infection (Fig. 1B). COX-2 mRNA was detected in macrophages exposed to *Leishmania* and LPS, as early as 1 hours after stimulation and maximal expression was observed between 2 and 4 hours (Fig. 1C). The signal disappeared after 8 hours in infected cells while in the case of LPS, a small increase of COX-2 mRNA was still observed at 12 hours that was completely gone after 24 hours (Fig. 1C). We also observed similar kinetics for the induction of cPLA₂ mRNA when cells were incubated in the presence of LPS but this signal was absent in *Leishmania*-stimulated macrophages (Fig. 1C). Assays, performed after stimulation of U937 cells for 6 hours, showed no significant difference with the use of various concentrations of LPS ranging from 10 to 100 ng/ml and optimal response was obtained with a parasite-to-macrophage ratio of 20:1 (data not shown).

Effect of COX-2 and signaling antagonists on *Leishmania*-induced PGE₂ production. Indomethacin is a well known antagonist of PGE₂ production that acts directly by blocking COX-2 activity required in prostaglandin synthesis (12). Stimulation of indomethacin-treated macrophages by LPS and *Leishmania* demonstrated a significant

reduction in PGE₂ production at dose $>10^{-8}$ M (Fig. 2A). Although PGE₂ synthesis had diminished in presence of indomethacin, COX-2 protein expression was not affected by this inhibitor in LPS- and *L. donovani*-stimulated macrophages (Fig. 2B).

In addition to COX-2, possible pathways implicated in the PGE₂ production could involve the participation of protein tyrosine kinases (PTKs) which have been previously reported (24) to be directly involved in PGE₂ synthesis. To investigate the possible involvement of PTK-mediated events in the PGE₂ production, we used genistein, a well-known inhibitor of this type of kinases. Pretreatment of U937 cells with genistein at doses >12.5 μ M for 6 hours resulted in a significant decrease in PGE₂ generation in response to *Leishmania* and LPS stimulation (Fig. 3A). However, exposure to various concentrations of genistein did not affect COX-2 protein expression (Fig. 3B). These results suggest a direct implication of PTK in the process of PGE₂ synthesis that is not involved in the upregulation of COX-2 mRNA.

Accumulating evidence of recent years has suggested that protein kinase C (PKC) plays a pivotal role in the regulation of eicosanoid synthesis (4, 25). Thus, the role of PKC was evaluated with the aid of H7, a well-known selective PKC inhibitor. *Leishmania*- and LPS-mediated PGE₂ production was significantly inhibited by H7 at doses >10 μ M (Fig. 4A). Figure 4B shows that COX-2 protein expression was similarly affected by PKC inhibition in both *Leishmania*- and LPS-stimulated cells.

Impact of these PKC and PTK inhibitors on COX-2 mRNA gene expression have been also evaluated in U937 macrophages, stimulated by *Leishmania* as described above. Our results revealed that inhibition of PKC by H7 resulted in a significant dose dependent reduction of COX-2 mRNA gene expression in response to *Leishmania*, whereas it remained unchanged when PTK was inhibited by genistein (Fig. 5). These data confirmed our observations reported above that these inhibitors can differentially affect COX-2 protein expression in response to *Leishmania* and LPS. Thus, these last results further indicate that whereas *Leishmania*-induced COX-2 expression is regulated through PKC-

dependent pathways, the parasite-macrophage interaction can also trigger a PTK-dependent signaling event necessary for complete activation conducting to PGE₂ secretion. Participation of both signaling cascades is necessary for the induction of macrophage PGE₂ by *Leishmania*. The present study reveals that the parasite *Leishmania* not only down-modulates macrophage functions by affecting important signaling pathways, but that it can also trigger biochemical cascade which signals ultimately conduct to the secretion of immunosuppressive molecules, for instance PGE₂, that can affect functions of surrounding uninfected cells. This capacity of *Leishmania* parasite to induce PGE₂ secretion must represent a key event in the pathophysiology process of leishmaniasis.

DISCUSSION

The intracellular parasite *Leishmania* has been reported to regulate various cellular functions in its host cell. In particular, infection of murine cells with *L. donovani* leads to an increased synthesis of PGE₂ that is accompanied by a marked augmentation of cyclooxygenase activity (11, 35, 38). However, the regulatory mechanisms through which *Leishmania* modulates eicosanoid production are not well defined. The results of the present investigation demonstrated an important secretion of PGE₂ in the *L. donovani*-infected human macrophages via a PKC-dependent activation of COX-2 that does not involve phospholipase activity.

Cellular biosynthesis of prostaglandins is a coordinated, sequential activity of the enzymes phospholipase A₂ (cPLA₂) and cyclooxygenase. Arachidonic acid is cleaved from cell membrane phospholipids by cPLA₂. The released arachidonic acid is then metabolized by cyclooxygenase. PGE₂ production was rapidly increased in macrophages infected with *L. donovani*, as early as 3 hours after infection. The results of this study indicated that these transient increases in PGE₂ release are attributable mainly to the induction of COX-2 and not to cPLA₂. This is supported by the fact that COX-2 is the enzyme catalyzing the rate-limiting step in the production of prostaglandins from arachidonic acid (8). More precisely, COX-2 is thought to play an important role in the production of prostaglandins at sites of inflammation (17, 21). Infection of macrophages by *L. donovani* upregulated COX-2 mRNA and protein expression; this activation of COX-2 was shown to induce PGE₂ production. Clearly, this will ultimately lead to the exacerbation of inflammation and worsening of the disease. It has been demonstrated that *in vivo* administration of indomethacin, which irreversibly inhibits COX-2 activity (12), can significantly decrease metastatic lesions in BALB/c mice infected with *L. major* as compared to control mice (11). Furthermore, this concurred with our observation that PGE₂ synthesis stimulated by *Leishmania* in cultured cell was blocked by indomethacin indicating inhibition of the COX-2.

A wide range of protein functions can be modulated by phosphorylation at all levels of protein synthesis including transcription, translation and posttranslation (19). The intracellular signaling mechanisms triggered by *L. donovani* that induce COX-2 activity are not yet well delineated. However, signal transduction pathways leading to the induction of COX-2 early gene expression may involve PKC and PTK (7, 16, 36). Based on this, we used PKC and PTKs inhibitors to elucidate the role of protein phosphorylation in *L. donovani*-infected macrophages. We found that pretreatment with the PTK inhibitor genistein of *L. donovani*-infected macrophages significantly reduced the production of PGE₂, in a dose-dependent manner. In agreement with this, previous observations of inhibition of PGE₂ production in pig endothelial cells (32) and human macrophages (13) by genistein treatment have been reported. Of interest, genistein did not affect the expression of COX-2 in macrophages infected by *L. donovani*. This result conflicts with previous data where tyrosine phosphorylation of COX-2 leading to PGE₂ production was observed (7, 9, 10). However, it is possible that effects of PTK on COX-2 phosphorylation vary according to the cell type studied and the agonist used because the studies of Blanco (7) and Chanmujan (10) were performed in human umbilical endothelial cells-stimulated by PMA or IL-1 α or rat macrophages-treated by LPS, respectively. In this light, upregulation of PGE₂ release by *L. donovani* in infected-macrophages may be due to the induction of certain PTKs not affecting the expression of COX-2.

In contrast, H7, which is known to inhibit PKC activity, had major inhibitory effects on both PGE₂ secretion and COX-2 protein expression in *L. donovani*-infected cells. This is consistent with the observations that calphostin C, another potent PKC inhibitor, significantly diminished cholecalciferol-induced PGE₂ release by inhibiting cholecalciferol-enhanced COX-2 mRNA and protein expression in human keratinocytes (20). In addition, regulation of COX-2 induction is also dependent on the activation of PKC since PKC depletion prevented its induction and enhanced synthesis of PGE₂ in human endothelial cells and esophageal adenocarcinoma cells in response to various

stimuli (7, 41). Hla et al. (18) have reported that PMA induces COX-2 mRNA in a human monocyte cell line indicating a possible involvement of PKC-dependent pathway in the transcriptional induction of the gene. Based on our data, we concluded that *L. donovani* might induce a PKC-dependent activation of COX-2 protein, intimately involved in the process of PGE₂ release. Guan et al. (14) have showed that IL-1 β induces overexpression of Delta MEKK1 resulting in activation of both c-Jun N-terminal kinases/extracellular signal-regulated kinases (JNK/SAPK) and p38 MAPK with subsequent induction of COX-2 expression and PGE₂ production. Therefore, further investigations aimed at verifying whether *L. donovani* activates a mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) cascade to upregulate COX-2 expression and PGE₂ synthesis with specific inhibitors becomes a reasonable and interesting direction for continued study. Cyclooxygenases could be potential substrates for tyrosine phosphorylation; in fact, several tyrosine groups are located close to the active site of these molecules (15). This is a good sign that COX-2 itself could represent a substrate for tyrosine phosphorylation. This is further supported by the observation of Parfenova et al. (32) that COX-2 activity increased with activation of protein tyrosine phosphorylation in pig endothelial cells.

In conclusion, this investigation proposes a novel signaling mechanism for PGE₂ production in *L. donovani*-infected macrophages by induction of COX-2 activity via a PKC-dependent pathway. Our results exclude any cPLA₂ modulation in this phenomenon. Initial contact of *L. donovani* with its host cell may induce a rapid activation of the PKC pathway thus increasing COX-2 activity and consequently upregulating PGE₂ release. On the other hand, infection with *L. donovani* also seems to activate a PTK-dependent pathway that directly affects the secretion of PGE₂ without regulating COX-2 activity. Understanding the signaling process that controls rapid and transient release of PGE₂ may lead to novel insights into the pathogenesis associated with *Leishmania*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. K. Neilson for the gift of the COX-2 probe. This study was funded through operating grants from the Medical Research Council of Canada to Martin Olivier (MO). MO is the recipient of a Junior 2 Scholarship from the Fonds de Recherches en Santé du Québec (FRSQ) and is a Burroughs Wellcome Fund Awardee in Molecular Parasitology. MO is member of a MRC group in Infectious Diseases.

REFERENCES

- 1- **Abdullah, K., W.A. Cromlish, P. Payette, F. Laliberté, I. Street and B.P. Kennedy.** 1995. Human cytosolic phospholipase A₂ expressed in insect cells is extensively phosphorylated on Ser505. *Biochim. Biophys. Acta.* **1244**:157-164.
- 2- **Arias-Negrete, S., K. Keller and K. Chadee.** 1995. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **208**:582-589.
- 3- **Ashford, R.W., P. Desjeux and P. De Raadt.** 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today* **8**: 104-105.
- 4- **Balsinde, J., B. Fernandez and E. Diez.** 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* **144**:4298-4304.
- 5- **Belley, A., and K. Chadee.** 1995. Eicosanoid production by parasites: From pathogenesis to immunomodulation? *Parasitology Today.* **11**:327.
- 6- **Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K.A. Siminovitch and M. Olivier.** 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired interferon- γ -triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3737-3744 .

- 7- **Blanco, A., A. Habib, S. Levy-Toledano and J. Maclouf.** 1995. Involvement of tyrosine kinases in the induction of cyclooxygenase-2 in human endothelial cells. *Biochem. J.* **312**:419-423.
- 8- **Bonney, R.J., and J.L. Humes.** 1984. Physiological and pharmacological regulation of prostaglandin and leukotriene production by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **35**:1-10.
- 9- **Buckley, B.J. and A.R. Whorton.** 1995. Arachidonic acid stimulates protein tyrosine phosphorylation in vascular cells. *Am. J. Physiol.* **269**:C1489-C1495.
- 10- **Chanmugan, P., L. Feng, S. Liou, B.C. Jang, M. Boudreau, G. Yu, J.H. Lee, H.J. Kwon, T. Beppu, M. Yoshida, Y. Xia, C.B. Wilson and D.H. Wang.** 1995. Radicol, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide and in experimental glomerulonephritis. *J. Biol. Chem.* **270**:5418-5426.
- 11- **Farrell, J.P. and C.E. Kirkpatrick.** 1987. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbating of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J. Immunol.* **138**:902-907.
- 12- **Gierse, J.K., S.D. Hauser, D.P. Creely, C. Koboldt, S.H. Rangwala, P.C. Isakson and K. Seibert.** 1995. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.* **305**:479-484.

- 13- **Glaser, K.B., A. Sung, J. Bauer and B.M. Weichman.** 1993. Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. Involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **45**:711-721.

- 14- **Guan, Z., S.Y. Buckman, A.P. Pentland, D.J. Templeton and A.R. Morrison.** 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK-1 ---> SEK1/MKK4 ---> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272**:12901-12908.

- 15- **Gui, Q., L.H. Wang, K.H. Ruan and R.J. Kulmacz.** 1996. Role of Val⁵⁰⁹ in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase by isoform-selective agents. *J. Biol. Chem.* **271**:19134-19139.

- 16- **Hamasaki, Y., J. Kitzler, R. Hardman, P. Nettekheim and T.E. Eling.** 1993. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arche. Biochem. Biophys.* **304**:226-234.

- 17- **Herschmann, A.W.** 1996. Prostaglandin synthase-2. *Biochem. Biophys. Acta.* **1299**:125-140.

- 18- **Hla, T., and K. Neilson.** 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:7384-7388.

- 19- **Hunter, T.** 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and the yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225-236.

- 20- **Kanekura, T., S.J. Laulederkind, K. Kirtikara, S. Goorha and L.R. Ballou.** 1998. Cholecalciferol induces prostaglandin E₂ biosynthesis and transglutaminase activity in human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **111**:634-639.
- 21- **Kujubu, D.A., B.S. Fletcher, B.C. Vasnum, R.W. Lim and H.R. Herschmann.** 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase-2/TIS10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **266**:12866-12872.
- 22- **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- 23- **Looker, D.L., S. Martinez, J.M. Horton, and J.J. Marr.** 1986. Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in the continuous human macrophage cell line U-937: Studies of drug efficacy and metabolism. *J. Infect. Dis.* **154**:323-327.
- 24- **Miller, C.C., P. Hale and A.P. Pentland.** 1994. Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **269**:3529-3533.
- 25- **Nishizuka, Y.** 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**:484-496.
- 26- **Olivier, M.** Modulation of Host Cell Intracellular Ca²⁺. 1996. *Parasitol. Today* **12**:145-150.

- 27- **Olivier, M. and C.E. Tanner.** 1987. Susceptibilities of macrophage populations to infection *in vitro* by *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **55**:467-471.
- 28- **Olivier, M. and C.E. Tanner.** 1989. Cyclosporin A in murine leishmaniasis. *Trop. Med. Parasit.* **40**:32-38.
- 29- **Olivier, M., K.G. Baimbridge and N.E. Reiner.** 1992. Inhibition of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*: evidence for a defect in agonist-induced calcium release. *J. Immunol.* **148**:1188-1196.
- 30- **Olivier, M., R.W. Brownsey and N.E. Reiner.** 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**:7481-7485 .
- 31- **Olivier, M., B.-J. Romero-Gallo, C. Matte, J. Blanchette, B.I. Posner, M.J. Tremblay and R. Faure.** 1998. Modulation of interferon- γ -induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine leishmaniasis progression. *J. Biol. Chem.* **273**:13944-13949.
- 32- **Parfenova, H., L. Balabanova and C.W. Leffler.** 1998. Posttranslational regulation of cyclooxygenase by tyrosine phosphorylation in cerebral endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **274**:C72-C81.
- 33- **Percival, M.D., M. Ouellet, C.J. Vincent, J.A. Yergey, B.P. Kennedy, and G.P. O'Neill.** 1994. Purification and characterization of recombinant human cyclooxygenase-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**:111-118.

- 34- Pradelles, P., J. Grassi, J. and Maclouf. 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* **57**:1170-1173.
- 35- Reiner, N.E., and C.J. Malemud. 1984. Arachidonic acid metabolism in murine Leishmaniasis (*donovani*): *Ex-vivo* evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell. Immunol.* **88**:501-510.
- 36- Rzymkiewicz, D.M., J. DuMaine and A.R. Morrison. 1995. Il-1 β regulates rat mesengial cyclooxygenase II gene expression by tyrosine phosphorylation. *Kidney Int.* **47**:1354-1363.
- 37- Schmidt, G.D. and L.S. Roberts. 1981. *Foundation of parasitology*. 2th edition, The CV Mosby Company. 795 pages.
- 38- Soares, M.B., J.R. Davies and R.G. Titus. 1997. An *in vitro* model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. *Infect. Immun.* **65**:2837-2845.
- 39- Turco, S.J. and Descoteaux, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**, 65-94.
- 40- Wilborn, J., D.L. DeWitt and M. Peters-Golden. 1995. Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Physiol.* **268**:L294-L301.

41- Zhang, F., K. Subbaramaiah, N. Altorki and A.J. Danneberg. 1998. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **273**:2424-2428.

FOOTNOTES

- 1) This work was supported by grants to Martin Olivier from the Medical Research Council of Canada.
- 2) Address correspondence and reprint requests to Dr Martin Olivier, Laboratoire et Service d'Infectiologie, Centre de Recherche du CHUL, 2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2. Tel.: (418) 656-4141 #7913, Fax.: (418) 654-2715.
- 3) Abbreviations used in this paper: COX, cyclooxygenase; cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂; H7, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride; PGE₂, prostaglandin E₂; PGI₂, prostaglandin I₂; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; PTK, protein tyrosine kinase; TBS-T, Tween-20 Tris-buffered saline.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Time courses of *Leishmania*- and LPS-induced PGE₂ production and COX-2 mRNA and protein expression. PMA-differentiated U937 cells were incubated with *Leishmania donovani* promastigotes (20:1, parasite to macrophage ratio) and LPS (100 ng/ml) for the indicated time periods. (A) *Leishmania*-induced PGE₂ generation. PGE₂ production was measured as described in Materials and Methods. Data are the mean ± S.E.M. of 3 experiments performed in triplicates. (B) *Leishmania*-induced COX-2 protein expression. Lysates from *Leishmania*- and LPS- stimulated cells were subjected to Western blotting and COX-2 protein levels revealed with an anti-COX-2 antibody. The results shown represents 3 experiments. (C) COX-2 and cPLA₂ mRNA gene expression levels determined by Northern blot. RNA isolated from *Leishmania*- and LPS stimulated cells were subjected to Northern analysis and hybridized with COX-2 and cPLA₂ cDNA probes. Results are representative of 3 experiments performed separately. The densitometric analysis were represent in the histogram and revealed the quantitative levels of COX-2 and cPLA₂ normalized over GAPDH mRNA expression.

Figure 2. Effect of indomethacin on *Leishmania*-induced PGE₂ production. (A) Differentiated U937 cells were treated with increasing doses of indomethacin (10⁻⁹-10⁻⁶ M) 1h prior to their infection by *L. donovani* promastigotes or treatment with LPS, for 6h. Supernatants were collected and PGE₂ production evaluated. Results are the mean ± S.E.M. of 2 experiments performed in triplicates. PGE₂ production induced by *Leishmania* was significantly reduced (P<0.05) by indomethacin at dose > 10⁻⁸ M. (B) *Leishmania*-induced COX-2 protein expression in presence of indomethacin. COX-2 expression has been evaluated by Western as described in Fig. 1B. Results are representative of 2 experiments independently performed.

Figure 3. Involvement of PTK-dependent events in *Leishmania*-induced PGE₂ production. (A) Effect of the PTK inhibitors genistein on *Leishmania*-induced PGE₂ generation. Phagocytic cells were stimulated with *Leishmania* and LPS for 6 hr in presence of increasing concentrations of genistein (12.5, 25 and 50 μ M). PGE₂ production was evaluated in collected supernatants as described above. Results are the mean \pm S.E.M. of 3 experiments performed in triplicates. PGE₂ production induced by *Leishmania* was significantly reduced ($P < 0.05$) by genistein at dose $> 12.5 \mu$ M. (B) Effect of genistein on *Leishmania*-induced COX-2 protein expression. COX-2 expression has been evaluated by Western as described in Fig. 1B. Results are representative of 3 experiments performed individually.

Figure 4. PKC-dependent *Leishmania*-induced PGE₂ production. (A) Effect of the PKC inhibitor H7 on *Leishmania*-induced PGE₂ generation. Phagocytic cells were stimulated with *Leishmania* and LPS for 6 hr in presence of increasing concentrations of H7 (5, 10 and 20 μ M). PGE₂ production was evaluated in collected supernatants as described above. Results are the mean \pm S.E.M. of 3 experiments performed in triplicates. PGE₂ production induced by *Leishmania* was significantly inhibited ($P < 0.05$) by H7 at dose $> 10 \mu$ M. (B) Effect of H7 on *Leishmania*-induced COX-2 protein expression. COX-2 expression has been evaluated by Western as described in Fig. 1B. Results are representative of 3 different experiments. Level of COX-2 expression induced by *Leishmania* was completely abrogated in a dose-dependent manner by the PKC inhibitor H7.

Figure 5. Effect of PKC and PTK inhibitors on *Leishmania*-induced COX-2 mRNA gene expression. PMA-differentiated U937 cells incubated with increasing concentrations of the PKC inhibitor H7 and the PTK inhibitor genistein were *Leishmania*- and LPS-stimulated for 6 hours. RNA isolated from *Leishmania*- and LPS stimulated cells were subjected to Northern analysis and hybridized with COX-2 cDNA probe. PKC inhibition was reflected by a significant dose-dependent reduction of COX-2 mRNA gene expression in response to *Leishmania* infection, whereas inhibition of PTK did not affect *Leishmania*-inducible macrophage COX-2 mRNA expression. This determination is representative of 1 out of 3 experiments. The histogram represents the densitometric analysis of COX-2 mRNA normalized to GAPDH.

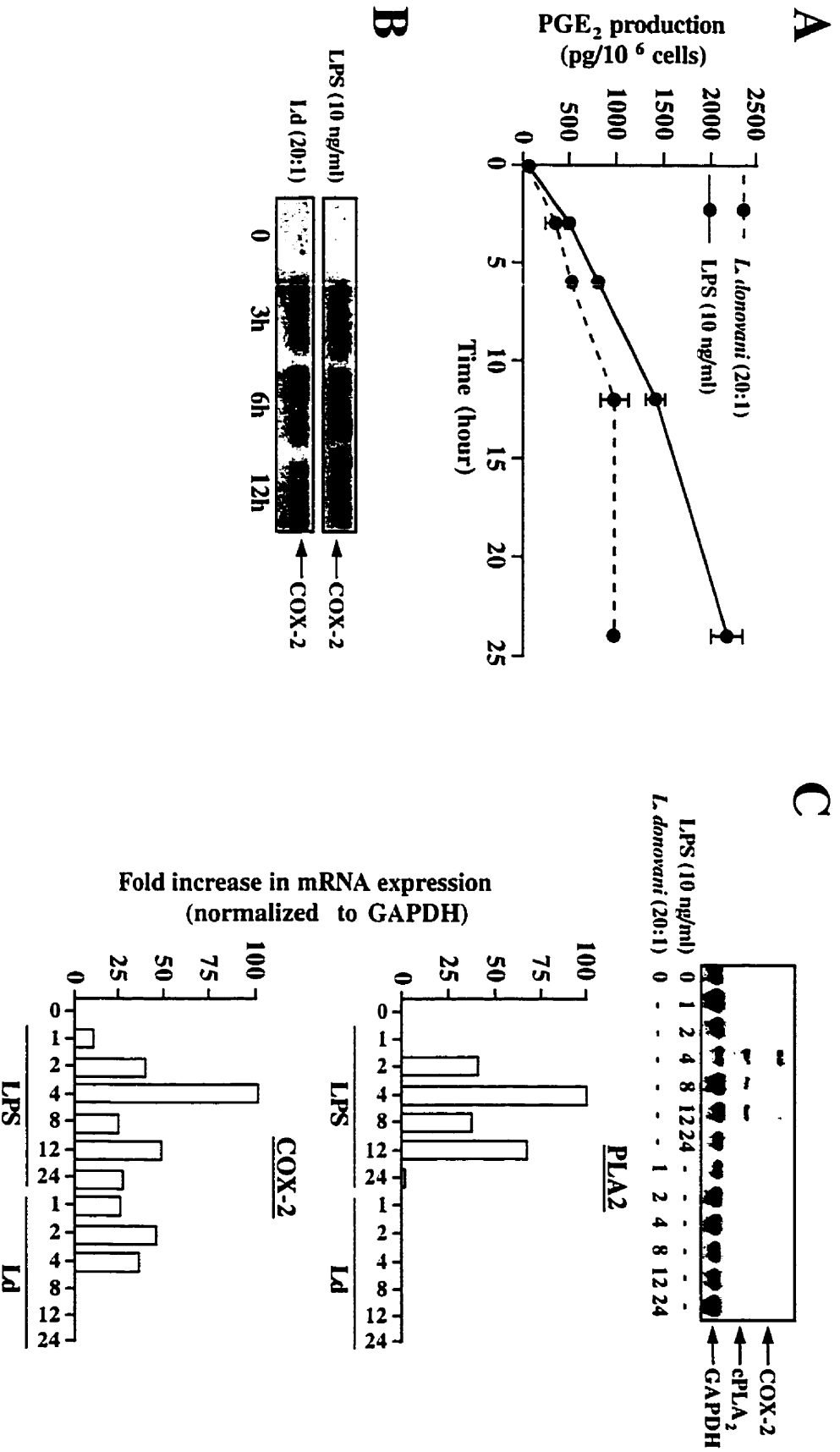
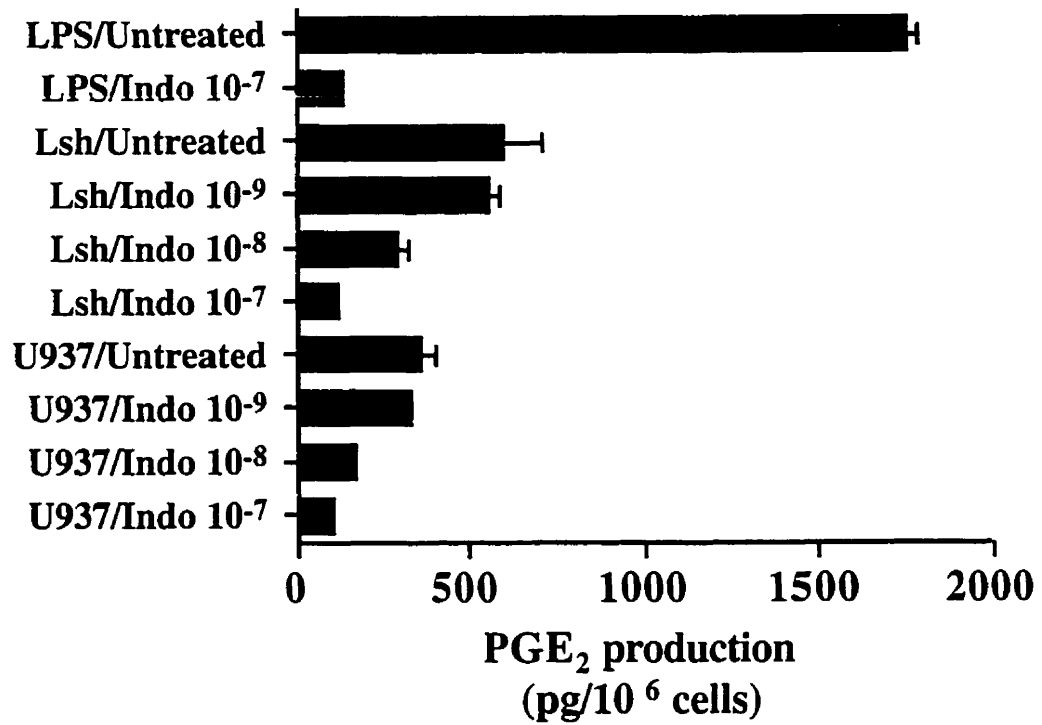


Figure 1

A



B

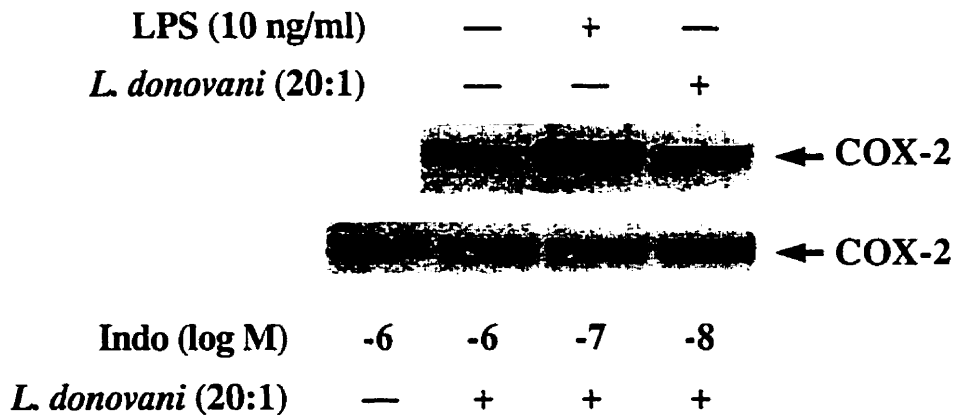
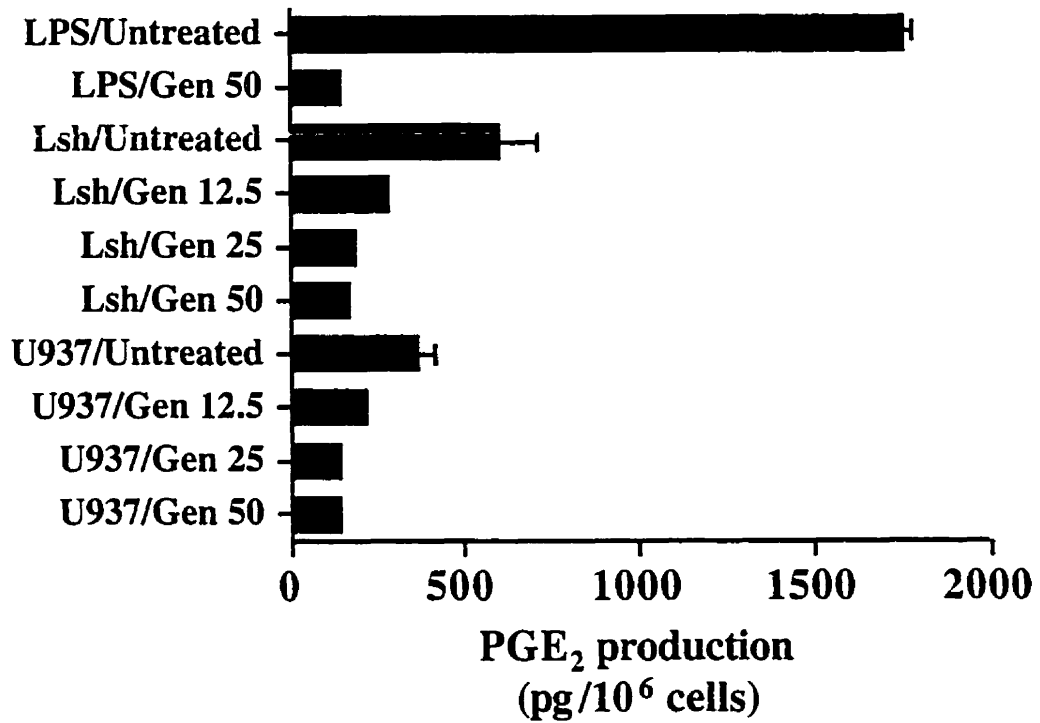


Figure 2

A



B

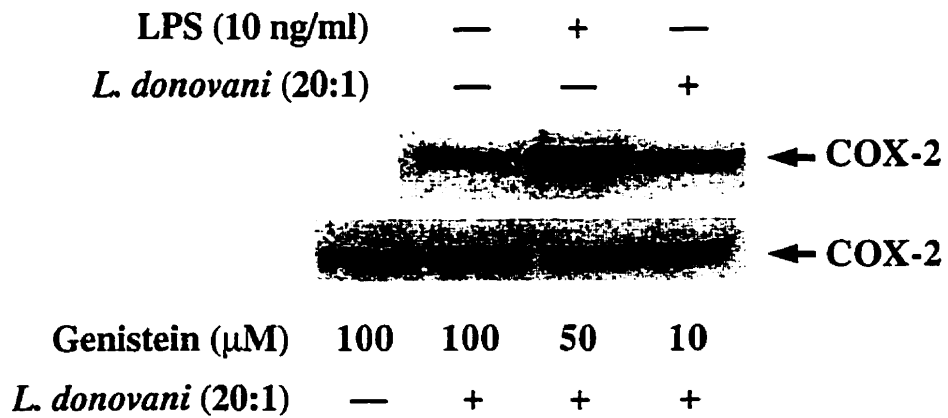
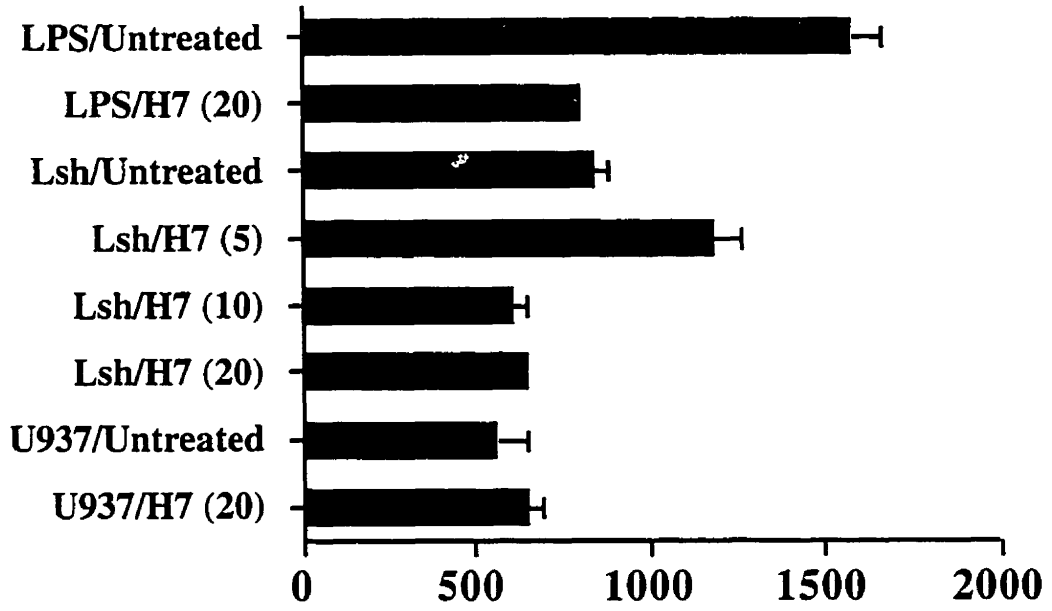


Figure 3

A



B

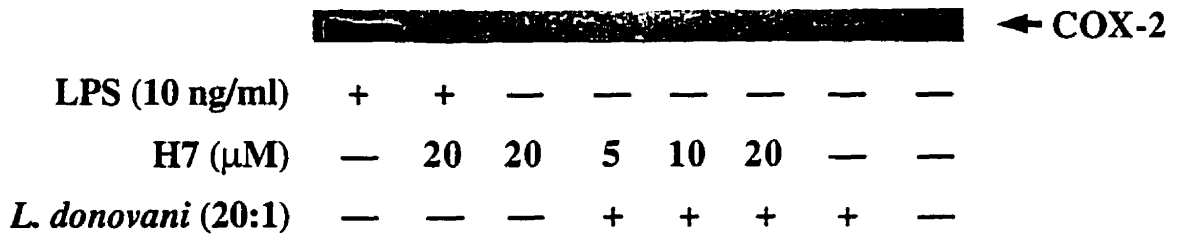


Figure 4

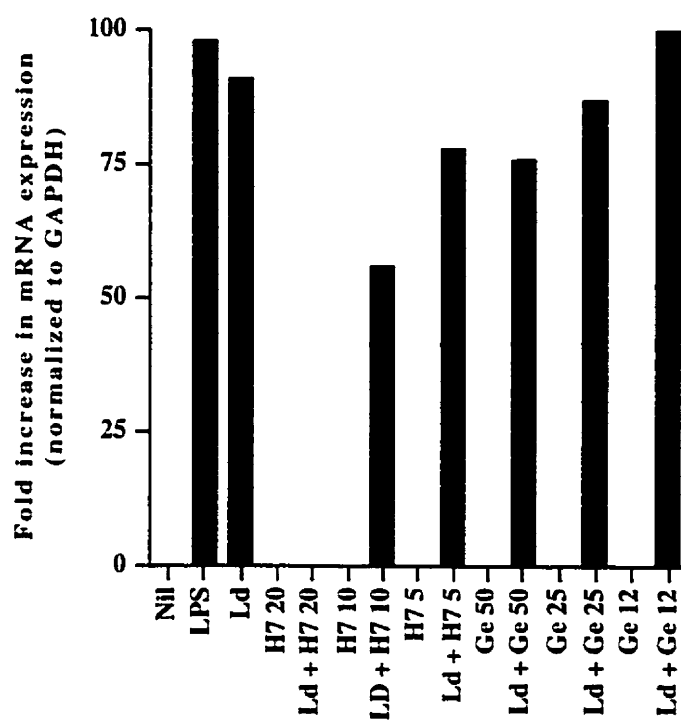
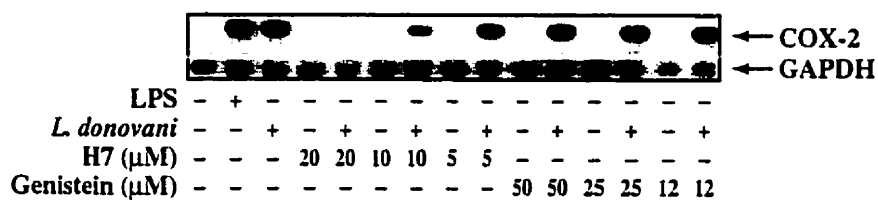


Figure 5

CHAPITRE 6

CONCLUSION

Les leucocytes jouent un rôle primordial lorsque les défenses de l'hôte sont requises. Leur recrutement aux sites d'infection permet l'induction d'une réponse inflammatoire efficace pour l'éradication de l'agent infectieux. Cette importante accumulation de cellules compétentes aux sites atteints est consécutive à l'action de plusieurs médiateurs de l'inflammation qui agissent de façon séquentielle. Ainsi, les molécules d'adhésion exprimées à la surface cellulaire permettent une première adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales puis, agissent de concert avec les chimiokines sécrétées dans le milieu afin d'induire l'adhésion ferme et la transmigration des cellules compétentes vers le site. Ces chimiokines sont produites principalement sous l'action de certaines cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α et l'IL-1 β . Elles forment un gradient de concentration afin de guider les leucocytes vers le site inflammé (215). Il semble que les chimiokines aient aussi la capacité d'activer ces cellules lorsqu'elles sont arrivées à destination afin qu'elles puissent produire leur action microbicide (216). De façon plus spécifique, ces cellules compétentes seraient impliquées dans le développement d'une réponse immune lors d'une infection à *Leishmania*. Les macrophages sont particulièrement impliqués dans le développement de l'infection de ce parasite à plusieurs niveaux (73-75). En premier lieu, ils servent de cellules hôtes et en conséquence, d'abri pour permettre la réplication du parasite. Néanmoins, ils participent à la réponse de l'hôte en agissant comme cellules présentatrices d'antigène (CPAs) et de façon plus importante, en sécrétant plusieurs cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et autres médiateurs de l'inflammation (notamment le NO et la PGE₂) (74-77).

Lors de cette étude, nous étions intéressés à discerner les différents événements inflammatoires et mécanismes de signalisation impliqués dans le développement des pathologies associées au parasite *Leishmania*. Le nombre d'infections associées aux leishmanioses augmente chaque année (environ 500 000 nouveaux cas) et le nombre d'individus atteints prend des proportions inquiétantes, soit plus de 15 millions répartis à travers le monde (17, 18). De plus, on associe de plus en plus la leishmaniose avec un développement prématuré de la maladie du SIDA chez les personnes séropositives (21). Il devient pressant d'élaborer une nouvelle thérapie qui permettra

l'éradication de l'infection car les traitements employés présentement occasionnent d'importants effets secondaires (42).

Dans un premier temps, notre étude portait sur la détermination des divers médiateurs de l'inflammation induits lors du développement des deux principales atteintes, soit la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. La première partie comportait en l'analyse de la cinétique des événements inflammatoires déclenchés (recrutement et population cellulaire, expression de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines ainsi que leurs récepteurs) lors des premiers instants de l'infection conduisant au développement de la leishmaniose cutanée ou de la leishmaniose viscérale, dans un modèle *in vitro* utilisant des macrophages murins. De façon plus spécifique, nous avons aussi utilisé un système *in vivo* de migration des leucocytes vers un site d'infection (modèle de la poche d'air chez la souris). Dans un deuxième temps, nous avons évalué les mécanismes employés par les composés peroxovanadiums afin de contrôler la progression de l'infection à *Leishmania* (leishmanioses cutanée et viscérale) chez différentes espèces de souris et plus particulièrement, l'implication de l'action microbicide dépendante de NO qui est déployée par les macrophages. Le modèle murin *in vivo* (modèle de la poche d'air chez la souris) nous a aussi permis de discerner le rôle joué par plusieurs autres médiateurs de l'inflammation (recrutement cellulaire, cytokines pro-inflammatoires et chimiokines). Dans la deuxième partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets du parasite sur les diverses voies de signalisation chez sa cellule hôte afin de réguler les différents médiateurs pro-inflammatoires pour permettre le développement de sa pathologie. Ainsi, nous avons évalué l'importance des PTPs dans les voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'expression des chimiokines chez des macrophages murins, *in vitro*, grâce au composé peroxovanadium (bpV(phen)) et d'une lignée de macrophages déficients pour la protéine SHP-1. Finalement, notre étude a porté sur l'identification des voies de signalisation modulées par le *L. donovani* chez des phagocytes humains U937 et étant impliquées dans la production de la PGE₂, reliée à l'exacerbation de sa pathologie (120).

La première étude a permis de constater que Lm et Ld régulent différemment les médiateurs de l'inflammation afin de favoriser le développement de leurs pathologies

respectives. Nos études *in vitro* chez des macrophages murins B10R ont permis de démontrer la capacité du parasite *Leishmania* à induire, rapidement mais de façon transitoire, l'expression de plusieurs chimiokines (MIP-1 α/β , MIP-2 et MCP-1). Ces résultats concordent avec l'expression rapide et transitoire de MCP-1 et KC (Gro- α) chez des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse infectés par Lm, rapportée par Racoosin et Beverley (428). Cependant, ce système *in vitro* ne représente pas la réalité car il ne tient pas compte des interactions cellule-cellule et on note l'absence d'importants médiateurs de l'inflammation. Ainsi, pour remédier à cette lacune, nous avons utilisé un modèle de la poche d'air chez la souris qui nous a permis de recréer le site d'inoculation du vecteur au niveau de la peau. Les parasites *Leishmania* sont transmis, sous leur forme promastigote, lors de la prise d'un repas sanguin du vecteur au niveau de la peau de l'hôte ce qui suggère l'activation de plusieurs types cellulaires résidant dans le derme (notamment les fibroblastes et les cellules de Langerhans) conduisant à la sécrétion et la régulation de différents médiateurs pro-inflammatoires. Nos résultats montrent que l'injection de *Leishmania* dans la poche d'air mène à une augmentation rapide et transitoire du contenu cellulaire de l'exsudat, sur une période de 48 hres. On a observé un même patron d'accumulation cellulaire selon les deux espèces de *Leishmania*. En accord avec nos observations, des études (429, 430) ont rapporté qu'en réponse à une injection sous-cutanée de parasites chez des souris, une accumulation maximale de neutrophiles et d'éosinophiles lors de la phase précoce de la leishmaniose cutanée suivie d'une forte réponse en macrophages prédominants par la suite, étaient observées par l'analyse histologique du derme des souris. L'aspect morphologique du parasite à l'intérieur des granulocytes lors des observations rapportées précédemment (62, 429, 430) suggère que le parasite subit une destruction intracellulaire déployée par les neutrophiles et les éosinophiles conduisant à la restriction de l'infection au niveau de la peau. À un stade plus tardif de l'infection, les macrophages/monocytes (cellules de Langerhans) auraient l'habileté de détruire le parasite suivant sa phagocytose. Toutefois, si le parasite parvient à inhiber les diverses fonctions microbicides du macrophage, ce dernier lui servirait d'abri pour sa réplication et la progression de l'infection. Nos résultats montrent que Lm est le plus puissant agent de recrutement cellulaire dans la poche d'air (31 X par rapport au

contrôle) ce qui nous permet de croire que cette importante accumulation de leucocytes pourrait diminuer la charge parasitaire et restreindre la propagation de l'infection tout en favorisant le développement de lésions caractéristiques au niveau de la peau. Au contraire, Ld induit un recrutement modéré de cellules compétentes (7 X par rapport au contrôle) au site ce qui suggère que cette espèce de *Leishmania* a développé une stratégie afin d'induire une faible réponse inflammatoire et permettre la progression de son infection vers ses organes cibles. Il serait intéressant de discerner quelle structure du parasite ou quel mécanisme cellulaire est responsable de cette capacité spécifique engendrée par les deux espèces de *Leishmania* à réguler différemment l'accumulation de cellules compétentes au site d'inoculation. Ceci permettrait l'élaboration possible d'un vaccin anti-leishmaniose par le blocage de l'action de cette structure sur le développement de la réponse inflammatoire. Certaines de nos observations non-publiées indiquent que la molécule de surface LPG de nos parasites quoique de structure différente selon les espèces de *Leishmania*, n'est pas responsable du recrutement différentiel observé entre les deux espèces de *Leishmania*. Par ailleurs, des études menées par Lo et collègues (208) démontrent que le LPG de Ld bloque l'expression de certaines molécules d'adhésion (E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1) stimulée au LPS à la surface des cellules endothéliales ce qui en conséquence altère la migration transendothéliale des monocytes humains. Ceci suggérerait une implication possible du LPG dans le recrutement cellulaire observé dans les poches d'air. Cependant, dans notre système, l'injection de LPG purifié des deux espèces de *Leishmania* résulte en une accumulation modérée et similaire de leucocytes dans la poche.

Les leucocytes attirés au site d'infection répondent à l'action de certains agents. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β sont sécrétées par les cellules compétentes activées afin de stimuler directement l'expression de gènes comme les chimiokines chez ces cellules (220). Dans notre étude, nous avons observé que l'injection de *Leishmania* dans la poche d'air conduisait à la libération de ces deux cytokines. Néanmoins, le Lm semble être encore une fois un meilleur agent que le Ld pour l'induction de la sécrétion de ces agents pro-inflammatoires. Ces deux cytokines pro-inflammatoires sont dépourvues d'activité chimiotactique, néanmoins elles sont associées

à l'induction de plusieurs gènes de chimiokines (431, 432) que nous avons analysée. Les résultats obtenus montrent que la population cellulaire mixte recrutée en réponse au *Leishmania* dans la poche concorde avec le patron d'expression des chimiokines mesuré. Suivant une infection par *Leishmania*, les cellules retrouvées dans l'exsudat de la poche expriment RANTES (seulement en réponse au *Leishmania*), IP-10, MIP-1 α/β , MIP-2 et MCP-1. Ces quatre dernières chimiokines sont aussi exprimées chez les cellules composant le tissu de la poche avec TCA-3 et l'éotaxine (pas d'expression de RANTES et IP-10). En effet, ces chimiokines sont reconnues pour attirer au site d'infection les monocytes/macrophages (RANTES, MIP-1 α/β , IP-10, MCP-1 et TCA-3), les neutrophiles (MIP-2) et les éosinophiles (RANTES, éotaxine, MIP-1 α et TCA-3). Le fait majeur réside en une plus forte expression de certaines chimiokines (RANTES >> IP-10, MIP-1 α/β) dans l'exsudat de la poche en présence de Lm en comparaison avec Ld qui pourrait être impliquée dans le recrutement cellulaire plus intense observé en présence de Lm. L'expression de RANTES semble représenter la différence majeure (6 X par rapport à Ld) entre les deux infections induites par les deux espèces de *Leishmania*. La RANTES est reconnue pour jouer un rôle clé dans le développement de diverses pathologies dont les réactions d'hypersensibilité retardée où les macrophages représentent la population cellulaire dominante (433). Cette forte expression de la RANTES observée en présence de Lm pourrait résulter en un confinement de l'infection ce qui est d'ailleurs supporté par une autre étude (356) où l'injection de RANTES humaine recombinante chez des macrophages humains, infectés par la suite avec *Trypanosoma cruzi*, engendre une meilleure capture et une destruction intracellulaire des trypomastigotes augmentée. De plus, *Leishmania* induit une expression des différents récepteurs de chimiokines de la classe CC (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 mais CCR4 indétectable) reconnus pour lier les diverses chimiokines induites par le parasite dans la poche suivant l'infection. Il est très important de mentionner que Ld induit plus faiblement l'expression de ces récepteurs et plus particulièrement celui qui lie à RANTES (CCR3) ce qui coïncide avec sa faible capacité à induire un recrutement cellulaire. Il est possible que le Ld évite l'action chimiotactique des chimiokines en induisant leur faible expression ainsi que celle de leurs récepteurs (particulièrement RANTES). Notre étude suggère que le Lm en induisant une

forte libération des cytokines pro-inflammatoires, pourrait agir directement ou indirectement sur l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs afin de hausser leur action chimiotactique dans le but d'obtenir une accumulation cellulaire maximale, responsable de la restriction de l'infection au niveau du site d'inoculation et du développement de la lésion cutanée caractéristique. Au contraire, le Ld agirait de façon à minimiser l'expression de ces médiateurs de l'inflammation afin de réduire l'accumulation de leucocytes au site dans le but de favoriser sa migration vers ses organes cibles. Il pourrait être intéressant de vérifier l'implication d'autres médiateurs de l'inflammation dans ce phénomène, spécialement les molécules d'adhésion car une étude a rapporté que le LPG de Ld contrecarre la migration trans-endothéliale des leucocytes par l'altération de l'expression de certaines molécules d'adhésion (208). De plus, afin de préciser le rôle joué par la RANTES dans le développement de la pathologie associée au Lm, nous pourrions traiter les souris avec un anticorps anti-RANTES dans la poche d'air puis mesurer l'accumulation cellulaire suivant l'infection à Lm ainsi que le développement de l'infection au niveau du coussinet plantaire. Par ailleurs, l'utilisation de souris déficientes pour les gènes de TNF- α et d'IL-1 β pourrait démontrer l'implication de ces deux cytokines pro-inflammatoires dans ce phénomène.

Lors de la deuxième partie de notre étude, nous avons utilisé les composés peroxovanadiums pour moduler l'activité des PTPs de l'hôte (176), ce qui résulte en l'induction *in vivo* des fonctions microbicides impliquées dans le contrôle de l'infection par le parasite *Leishmania*. En effet, nos études précédentes (184) ont démontré que le traitement au bpV(phen), un composé peroxovanadium, chez des souris (*in vivo*) et des macrophages (*in vitro*) infectés par Lm ou Ld résultait en une diminution significative de la croissance parasitaire et une hausse de la libération de NO. Cependant, bien que ces résultats soient de bon augure pour le développement d'une thérapie anti-leishmaniale efficace, les processus de signalisation impliqués dans ce contrôle de l'infection à *Leishmania* par le traitement au bpV(phen) sont encore obscurs. Notre étude portait sur l'identification des mécanismes protecteurs modulés par l'injection de ces composés peroxovanadiums chez la souris. Pour ce faire, nous avons traité des souris avec des composés peroxovanadium (bpV(phen) et bvP(pic)). L'analyse des protéines contenues

dans le foie des animaux a montré une phosphorylation rapide et transitoire des résidus tyrosine. Ce phénomène coïncide avec une augmentation de l'expression de la protéine iNOS dans le foie des animaux traités. Ceci suggère que les composés peroxovanadiums ont la capacité de réguler l'expression *in vivo* d'iNOS qui joue un rôle pivot dans l'action microbicide déployée par les macrophages afin de détruire le parasite. On a observé une forte expression de la protéine iNOS concomitante avec la détection de NO dans le sang des animaux. Ainsi, les peroxovanadiums auraient la capacité de contrôler la progression de l'infection en modulant l'expression de la protéine iNOS.

Afin de préciser la régulation d'iNOS par les composés peroxovanadiums pour le contrôle de l'infection à *Leishmania*, nous avons utilisé un inhibiteur bien connu d'iNOS, l'aminoguanidine, lors d'un traitement avec les composés peroxovanadiums chez des souris BALB/c infectées par le Lm. On a remarqué que chez les souris traitées uniquement avec les composés peroxovanadiums, l'infection était enrayée (diminution significative de plus de 75% de l'infection), représentée par une absence d'une inflammation des coussinets plantaires et de lésions cutanées. Au contraire, le traitement simultané des souris avec l'aminoguanidine et les composés peroxovanadiums amène l'apparition de l'inflammation qui, toutefois, demeure inférieure à l'inflammation résultante d'une infection à Lm uniquement. De plus, l'ajout de bpV(phen) et bpV(pic) diminue de façon significative la charge parasitaire dans les nodules lymphoïdes des animaux traités. Cependant, comme la charge parasitaire observée chez les souris traitées à l'aminoguanidine demeure plus basse que celle mesurée avec le contrôle, il est possible que l'effet des composés peroxovanadiums sur l'infection à Lm requiert l'action d'autres médiateurs. Un traitement similaire appliqué chez des souris infectées par Ld montre des résultats similaires sur la capacité des composés à réduire la charge parasitaire dans le foie des animaux. Toutefois, nous avons noté une différence entre les deux types de leishmanioses au niveau de la charge parasitaire. Les souris traitées à l'aminoguanidine ont des taux similaires de parasites à ceux retrouvés chez les souris non-infectées par le Ld alors que lors de la leishmaniose cutanée ces taux demeurent toujours inférieurs. Ceci suggère que l'infection par le Ld implique un rôle clé pour le NO, ce qui concorde avec les faits rapportés par Murray et Nathan (434) où l'infection à Ld se poursuit chez des

souris déficientes pour le gène de iNOS. Ainsi, la production de NO modulée par les peroxovanadiums représenterait le mécanisme majeur régulant le développement d'une pathologie spécifique à chaque espèce de *Leishmania*. Afin de supporter cette hypothèse nous avons utilisé des souris manipulées et croisées génétiquement afin qu'elles n'expriment pas les gènes Nramp et iNOS. Le traitement par le bpV(phen) diminue l'inflammation du coussinet plantaire chez les souris contrôles infectées par le Lm tandis qu'il n'y a aucune réduction de l'inflammation chez les souris déficientes infectées. Ce dernier résultat nous a permis de démontrer un rôle certain pour le NO dans le contrôle de l'infection à *Leishmania*, modulé par les composés peroxovanadiums.

Afin d'établir si d'autres événements inflammatoires seraient aussi reliés à la réduction de la charge parasitaire, nous avons utilisé le modèle de la poche d'air de souris. Lima et collègues (62) ont récemment démontré que l'infiltration massive des leucocytes (neutrophiles et éosinophiles) observée en réponse à Lm au site d'inoculation est nécessaire pour le contrôle précoce de l'infection à *Leishmania*. Nos résultats montrent que le pré-traitement avec le bpV(phen) de souris infectées avec le Lm résulte en une importante accumulation de cellules dans l'exsudat de la poche (composée à 70% de neutrophiles). Cet important recrutement de neutrophiles pourrait être associé avec la restriction de l'infection au site d'inoculation, comme il a été montré auparavant (62). De plus, la production de divers médiateurs de l'inflammation a aussi été évaluée dans l'exsudat de la poche de ces souris. Le bpV(phen) représente encore une fois un puissant agent modulateur de la libération de NO ainsi que de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1 β) et de chimiokines (MCP-1 et MIP-2) dans l'exsudat de la poche. Ainsi, le bpV(phen) induit l'expression des gènes de plusieurs chimiokines (RANTES, MIP-1 α β , MIP-2 et MCP-1) potentiellement responsable de cette importante accumulation de leucocytes dans la poche d'air, particulièrement de neutrophiles. La chimiokine MIP-2 qui est très fortement exprimée au niveau de son ARNm et de sa protéine en réponse au bpV(phen), est reconnue pour son action chimiotactique spécifique envers les neutrophiles (437). Ceci concorde avec l'accumulation majeure de neutrophiles observée dans l'exsudat de la poche en réponse au bpV(phen). Les cytokines pro-inflammatoires, soit l'IL-6 et l'IL-1 β , ont été associées dans le processus de régulation de l'expression de cette

chimiokine (438). De plus, cette forte libération de NO pourrait expliquer en partie la hausse de l'activité microbicide observée chez les souris traitées au peroxovanadium lors de l'infection à *Lm* car des études l'ont associé au développement de l'inflammation et à la régulation de la migration des neutrophiles (435, 436). En effet, l'étude de Ajuebor (436) montre que l'induction de l'inflammation chez des souris par l'injection de zymosan se caractérise par une importante accumulation de PMNs dans la cavité péritonéale des animaux. Ils associent cet important recrutement de PMNs avec l'augmentation des taux des chimiokines MIP-1 α , MIP-2 et MCP-1 (MIP-2 et MCP-1 étant aussi fortement induites dans notre système). En plus, chez les souris n'exprimant pas le gène iNOS, ils ont noté une altération de la migration des PMNs accompagnée d'une diminution des taux de MIP-2 dans la cavité péritonéale (aucun effet sur MIP-1 α et MCP-1). L'utilisation de souris déficientes pour le gène iNOS pourrait nous permettre de mieux déterminer l'implication de NO dans la production de chimiokines observées en réponse au traitement par le bpV(phen), ce dernier menant au contrôle de l'infection à *Leishmania*. Cette étude a donc permis d'établir que la modulation des PTPs par les composés peroxovanadiums amène le contrôle de l'infection à *Leishmania*. Ces composés semblent médier leur action par l'activation d'une série d'événements inflammatoires incluant principalement la libération de NO et de cytokines pro-inflammatoires. Ceci va résulter en une augmentation de l'expression de certaines chimiokines qui vont à leur tour attirer un très grand nombre de cellules compétentes au site d'infection. En conséquence, il y aura une hausse de l'activité microbicide et de la destruction parasitaire. L'utilisation des composés peroxovanadiums représente une avenue thérapeutique intéressante pour le contrôle de la progression de l'infection à *Leishmania* mais d'autres études sont requises afin d'évaluer leurs effets secondaires.

Lors de ce deuxième volet de notre étude, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression des chimiokines car ces dernières ont été associées de près au développement des leishmanioses lors de nos résultats précédents. Jusqu'à maintenant, peu d'études portent sur la détermination des divers mécanismes de signalisation conduisant à l'expression de ces agents chimioattractants malgré leur rôle clé dans le développement de réactions inflammatoires (219). Les différentes voies de signalisation,

reliées à une variété de fonctions cellulaires, impliquent la déphosphorylation de résidus tyrosines spécifiques effectuée par les PTPs (168-170, 172). Cette régulation positive ou négative de la signalisation intracellulaire peut être étudiée à l'aide des composés peroxovanadiums qui sont des inhibiteurs spécifiques de PTPs (176, 177). Notre étude montre que le traitement de macrophages murins B10R par le bpV(phen) conduit à l'expression rapide de diverses chimiokines. Les résultats obtenus concernant la production de chimiokines *in vitro* avec le bpV(phen) sont comparables à ceux observés lors notre étude *in vivo* dans le modèle de la poche d'air chez la souris. En effet, l'injection de ce composé peroxovanadium a induit l'expression de plusieurs chimiokines (RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2 et MCP-1) dans la poche d'air ainsi que chez une lignée de macrophage murin *in vitro* (RANTES, MIP-1 α/β , MIP-2, IP-10 et MCP-1). Ainsi, le traitement par le bpV(phen) induit un patron de chimiokines presque similaire que ce soit lors d'études *in vivo* ou *in vitro*. Toutefois, l'efficacité de ce composé est variable selon les chimioattractants (plus puissant pour la MIP-2).

En conséquence, on peut affirmer que les PTPs jouent un rôle important comme régulateur négatif dans la signalisation menant à l'expression des chimiokines car lorsqu'on bloque leur action par l'ajout de bpV(phen), on remarque une forte expression de ces gènes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres études où les PTPs régulent de façon négative la signalisation cellulaire associée, par exemple, avec le récepteur des cellules B (BCR) (170). L'effet engendré par le bpV(phen) sur l'expression des chimiokines est supérieur à celui obtenu avec une stimulation au LPS et encore plus élevé que l'infection à Lm chez les macrophages murins. Cependant, lorsque le bpV(phen) est ajouté en même temps que le LPS, l'effet mesuré sur l'expression de gènes est beaucoup plus élevé que celui observé en présence du LPS seul. Par contre, l'addition du composé peroxovanadium et du parasite Lm aux macrophages n'affecte pas l'expression des chimiokines. Il semble qu'à l'inverse le bpV(phen) induit une réduction de l'expression des MIP-1 α/β et de la MCP-1 à près de 25% et n'a aucun effet significatif sur la MIP-2. Ces résultats suggèrent que le LPS et le parasite *Leishmania* empruntent des voies de signalisation différentes afin d'induire l'expression des chimiokines dans la cellule. Le LPS interagit principalement sur sa cellule cible par sa liaison au CD14 et au

CD11b/ CD18 (439) alors que le parasite peut lier divers récepteurs à la surface cellulaire (notamment le récepteur mannose-fucose, le récepteur du complément 1 et 3 et le récepteur de fibronectine) (440). Ainsi, la voie de signalisation engendrée par la liaison du LPS à son récepteur serait régulée par l'action de certaines PTPs alors que le *Leishmania* en liant son récepteur induit une dysrégulation de la signalisation dépendante des PTKs (206) en promouvant l'activité des PTPs. L'inhibition de l'activité des PTPs produite par l'ajout de bpV(phen) en présence de Lm pourrait être responsable de la réduction partielle de l'expression de la MCP-1 et des MIP-1 α/β observée dans nos résultats.

Nos études se sont par la suite concentrées sur l'implication d'une importante PTP, la SHP-1, reconnue principalement pour agir de façon négative sur la signalisation intracellulaire. En effet, plusieurs études (168-170) ont rapporté son action inhibitrice sur la signalisation induite par le BCR, le récepteur de l'érythropoïétine, le récepteur c-kit et le récepteur du CSF-1. Afin d'effectuer nos expériences, nous avons utilisé une lignée de macrophages dérivés de souris motheaten (me) qui n'expriment pas de protéine SHP-1. Ce type de souris est associé avec le développement d'une sévère maladie auto-immune et d'immunodéficience (162, 163). Chez ces cellules, on a observé l'expression de plusieurs chimiokines en réponse au LPS et au Lm (MCP-1, MIP-2, MIP-1 α/β et RANTES). Cependant, l'expression d'IP-10 semble requérir particulièrement l'activité de la SHP-1 car elle a été induite seulement chez les cellules contrôles LMme. Au contraire, la TCA-3 semble être affectée par la régulation négative de la SHP-1 parce que son expression ne fut observée que chez les cellules déficientes me. Il est intéressant de préciser qu'au niveau basal, chez les cellules me, on observe une forte expression des chimiokines et en particulier, MIP-2 (4 X plus par rapport aux autres chimiokines). En absence de stimulus, la protéine MIP-2 se révèle être 3 fois plus libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules me comparativement aux cellules LMme. Ainsi, selon nos résultats, la MIP-2 semble représenter la chimiokine qui est la plus fortement régulée négativement par la SHP-1. Il est intéressant de noter que la MIP-2 est un puissant chimioattractant des neutrophiles (441). Plusieurs études ont reconnu son implication dans le développement d'une variété de maladies inflammatoires, particulièrement l'arthrite rhumatoïde par le

recrutement et l'activation des cellules dans les joints et les tissus synoviaux des patients (362). Dans notre système, la MIP-2 pourrait représenter un médiateur important du développement de la maladie auto-immune et d'immunodéficience retrouvée chez les souris motheaten. L'injection d'anticorps anti-MIP-2 chez les souris motheaten pourrait nous permettre de mieux cerner le rôle joué par cette chimiokine dans la maladie associée à la déficience pour la protéine SHP-1 chez ces souris. Ceci nous permettrait peut-être d'établir une nouvelle thérapie pour la maladie auto-immune et d'immunodéficience. De façon plus spécifique, nous pourrions vérifier indirectement l'implication de la SHP-1 dans la régulation de la chimiokine MIP-2, en utilisant des souris déficientes pour le gène MIP-2.

Pour la dernière partie de notre étude, nous nous sommes penchés sur la détermination de la signalisation cellulaire engendrée chez le macrophage par le parasite *Leishmania* conduisant à la libération de la PGE₂ (121, 124). Reconnu pour réguler une variété de fonctions cellulaires chez sa cellule hôte, le parasite *Leishmania* induit une hausse rapide de la sécrétion de la PGE₂ qui semble être impliquée dans l'exacerbation de la maladie chez le patient (121). La synthèse de la PGE₂ provient d'une séquence coordonnée impliquant la libération de l'acide arachidonique des phospholipides de la membrane cellulaire par l'action de la PLA_{2c} puis de la métabolisation de l'acide arachidonique en prostaglandines et autres métabolites (119). Nos résultats supportent le fait que la COX-2 est l'enzyme qui limite la production des prostaglandines dérivant de l'acide arachidonique (442) car la production de la PGE₂ induite par le Ld chez des macrophages humains U937 serait reliée principalement à l'induction de la COX-2. Ce processus ne semble pas nécessiter la participation de la PLA_{2c}. En effet, le Ld augmente rapidement l'expression de l'ARNm et de la protéine COX-2 alors qu'il n'a aucune action sur l'expression de la PLA_{2c}. Comme l'administration d'indométhacine dans un système *in vivo* inhibe de façon irréversible l'activité de la COX-2 (443), nous avons utilisé cet inhibiteur de la COX-2 dans notre modèle ce qui a résulté en une libération de la PGE₂ diminuée chez des cellules infectées par le Ld. Ainsi, nous avons associé la libération de la PGE₂ induite par le Ld avec une hausse de l'activité de la COX-2 induite par le parasite. Toutefois, nous avons décidé d'approfondir notre étude afin d'élucider quel mécanisme de

signalisation était employé par le parasite afin d'agir sur la COX-2. Diverses études (444-446) ont déjà rapporté que l'expression du gène de la COX-2 pourrait requérir les voies de signalisation dépendantes de la PKC et des PTKs. En conséquence, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de ces deux voies de signalisation chez des macrophages infectés par *Ld*. Nous avons observé que le pré-traitement à la génistéine, un inhibiteur de PTKs, des macrophages infectés par *Ld* résulte en une diminution de la PGE₂. Cette inhibition est dépendante de la dose de l'inhibiteur utilisé. Néanmoins, la génistéine n'a pas affecté l'expression de la protéine COX-2 chez les macrophages infectés. Cependant, d'autres études ont rapporté une phosphorylation de la COX-2 sur ses résidus tyrosines qui menait à la libération de la PGE₂ (444, 447, 448). Il est possible que ce phénomène soit variable selon le type cellulaire et l'agoniste utilisés. Par ailleurs, suivant la traduction de son ARNm en protéine, il demeure que la COX-2 doit être phosphorylée afin d'effectuer son action. L'ajout de H7, l'inhibiteur de la PKC, amène une inhibition majeure de l'expression de la protéine COX-2 ainsi que de la sécrétion de la PGE₂ chez des macrophages infectés. Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez des kératinocytes humains traités par la calphostine C, un autre inhibiteur connu de la PKC, où ils rapportent une diminution de la sécrétion de la PGE₂ ainsi que l'expression de la COX-2 stimulées par la cholécalciférole (449). Ainsi, nos résultats suggèrent que le parasite *Leishmania* induit la libération de la PGE₂ en augmentant l'activité de la COX-2, par une voie dépendante de la PKC. Le parasite semble activer la voie de signalisation dépendante de la PKC qui, à son tour, va induire l'expression de la COX-2 qui sera phosphorylée et mènera à une libération de la PGE₂. Cependant, le parasite semble aussi intervenir sur la sécrétion de la PGE₂ en empruntant une deuxième voie de signalisation dépendante des PTKs, sans affecter l'expression du gène de la COX-2 mais qui pourrait intervenir au niveau de la phosphorylation de cette protéine. Ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes régulant les événements inflammatoires impliqués dans le développement des leishmanioses. Il est nécessaire d'évaluer d'autres médiateurs de signalisation cellulaire dans ce processus comme certaines familles de kinases. En effet, Guan et al. (450) ont montré que l'IL-1 β induisait une surexpression de la MEKK1, activant à son tour la famille des JNK/SAPK et p38 kinases qui résulte en

une induction de l'expression de la COX-2 et la libération de la PGE₂. Ils suggèrent que la COX-2 elle-même représenterait un substrat pour la phosphorylation par les PTKs à cause de plusieurs groupes de tyrosine localisés près de son site actif (451). De plus, nous pourrions déterminer l'effet médié par les deux voies de signalisation (PKC et PTK) empruntées par le parasite sur la libération d'acide arachidonique car l'étude menée par Reiner (124) suggère une altération du métabolisme de l'acide arachidonique par l'action du *Leishmania* sur l'activité de la voie des cyclooxygénases.

En somme, notre étude a permis de mieux comprendre la cinétique des événements inflammatoires impliqués dans le développement des pathologies associées avec la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. De plus, nous avons déterminé certaines voies de signalisation modulées par le parasite afin de contrôler diverses fonctions de sa cellule hôte et d'enrayer les défenses de l'hôte dans le but de favoriser la progression de son infection. Ainsi, le parasite *Leishmania* a la capacité d'induire la libération de certains médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et PGE₂) impliqués dans le développement ainsi que l'exacerbation de sa maladie. Toutefois, selon l'espèce de *Leishmania* impliquée (*L. major* ou *L. donovani*), la régulation de ces événements inflammatoires est différente afin de conduire au développement de sa pathologie spécifique. Le Ld agit afin d'induire faiblement plusieurs des fonctions de sa cellule hôte (soit la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de chimiokines ainsi que de leurs récepteurs) ce qui lui permet d'échapper au développement d'une réaction inflammatoire cutanée au site d'inoculation et lui fournit l'opportunité d'atteindre ses organes cibles pour la propagation de son infection en favorisant sa survie. Par contre, il peut aussi induire certaines voies de signalisation (dépendante de la PKC, dépendante des PTPs/PTKs) qui vont conduire à la libération de certains agents inflammatoires (dont la PGE₂) exacerbant son infection. Au contraire, le Lm qui est l'agent causal de la leishmaniose cutanée, induit les médiateurs inflammatoires (soit la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de chimiokines ainsi que de leurs récepteurs) afin de produire une inflammation caractéristique au site d'inoculation. Ces résultats sont prometteurs pour l'élaboration d'une nouvelle thérapie

anti-leishmaniale. Comme il l'a été mentionné précédemment, l'utilisation d'anticorps, d'antagonistes ou de souris déficientes pour les gènes de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) ou chimiokines/récepteurs (particulièrement RANTES) pourraient nous permettre de mieux discerner leur implication dans le développement des leishmanioses cutanées. De plus, nous avons évalué les mécanismes employés par les composés peroxovanadiums afin de contrôler le développement de l'infection à *Leishmania*. Ces composés représentent d'importants agents thérapeutiques pour le traitement de leishmanioses. Leur action semble impliquer particulièrement l'induction du gène iNOS résultant en une importante libération de NO, connu pour sa grande capacité à induire la destruction intracellulaire du parasite. Ces mêmes composés peroxovanadiums sont aussi reliés à l'induction de l'expression de chimiokines. Ainsi, les chimiokines peuvent participer de plusieurs façons au développement des leishmanioses, dépendamment de la chimiokine qui est particulièrement induite. En effet, elles pourraient agir en réponse au Lm afin d'induire une importante réaction inflammatoire menant au développement de la leishmaniose cutanée. Par ailleurs, elles seraient aussi aptes à permettre un certain contrôle de l'infection lorsqu'elles sont induites par les composés peroxovanadiums. Nos résultats démontrent la complexité des différentes fonctions associées aux chimiokines pour le développement de pathologies et plus spécifiquement, des leishmanioses cutanées et viscérales. Le parasite *Leishmania* a développé de multiples moyens afin de favoriser son infection chez son hôte et une meilleure compréhension de ces mécanismes pourra nous fournir des indications pour l'élaboration d'un nouveau traitement.

CHAPITRE 7

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **Golvan, Y.-V.** 1978. *Eléments de parasitologie médicale.* 3ième édition. *Flammarion Médecine-Sciences.* 616 pages.
- 2- **Schmidt, G.D. et L.S. Roberts.** 1981. *Foundation of parasitology.* 2ième édition. *The CV Mosby Company.* 795 pages.
- 3- **Framan, B.** 1985. *Burrows textbook of microbiology.* 22ième édition. *WB Saunders Company.* 1038 pages.
- 4- **Joklik, Willet, Amos et Wilfert.** 1988. *Zinsser microbiology.* *Apleton and Lange.* 1053 pages.
- 5- **Roitt, I., J. Hale et D. Hale.** 1988. *Immunologie fondamentale et appliquée.* 2ième édition. *MEDS/Mc Graw-Hill Health-Care Groups.* Chapitre 17.
- 6- **Alexander, K. et C. Wong.** 1985. *Molecular genetics of the parasitic protozoan Leishmania.* *Biochem. Cell. Biol.* 73:235-240.
- 7- **Jawetz, Melnick, Adelberg, Brooks et Bertel.** 1989. *Medical microbiology.* 18ième édition. *Lange Medical Book.* 592 pages.
- 8- **Caceres-Dittmar, G., M.A. Sanchez, O. Oriol, G. Kraal et F.J. Tapia.** 1992. *Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis.* *J. Invest. Dermatol.* 99:955-985.
- 9- **Convit, J., M.E. Pinardi et A.J. Rondon.** 1972. *Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host.* *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:603-610.

- 10- **Bryceson, A.D.M.** 1970. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**:369-379.
- 11- **Marsden, P.D., R.N. Sampaio, L.F. Gomes, J.M. Costa, E.M. Netto, E.P. Viega et E.A. Llanos-Cuentas.** 1985. Lone laryngeal leishmaniasis. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**:424-425.
- 12- **Caster, M., A. Agnelli et A.J. Rondon.** 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **27**:176-186.
- 13- **Manson-Bahr, P.E.C.** 1959. East-African kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* **53**:123-137.
- 14- **Carvalho, E.M., R.S. Teixeira et W.D. Johnson Jr.** 1981. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect. Immun.* **33**:498-502.
- 15- **Pearson, R.D. et A. de Queiroz Sousa.** 1985. Leishmaniasis species (kala-azar, cutaneous and mucocutaneous) dans *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandel, G.L., R.E. Douglas, J.E. Bennett. (éditeurs). John Wiley and Sons. New York. 1522-1531.
- 16- **Morgan, F.M., R.H. Watten et R.E. Kuntz.** 1962. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. A case report from Taiwan (Formosa). *J. Formosa. Med.* **61**:282-291.
- 17- **Ashford, R.W., P. Desjeux et P. de Raat.** 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today* **8**:104-105.

- 18- **World Health Organization.** 1981. Epidemiology of the leishmaniasis. Rapport du 3ième Congrès des Groupes Scientifiques de Travail sur les Leishmanioses. TDR/LEISH.SWG (3) 81.3. World Health Organization.
- 19- **World Health Organization.** 1990. WHO Tech. Rep. Ser. No.793.
- 20- **Liew, F.Y.** 1982. Functional heterogeneity of CD4⁺ T cells in leishmaniasis. *Immunol. Today* 10:40-45.
- 21- **Berman, J.D.** 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24:684-703.
- 22- **Marsden, P.D. et T.C. Jones.** 1985. Clinical manifestations, diagnosis and treatments of leishmaniasis. dans *Leishmaniasis*. Chang, K.P. et R.S. Bray. (éditeurs). *Elsevier Science*. Amsterdam. 183-198.
- 23- **Kumar, R., P. Kumar, R.K. Chowdhary, K. Pai, C.P. Mishra, K. Kumar, H.P. Pandley, V.P. Singh et S. Sundar.** 1999. Kala-azar epidemic in Varanasi district, India. *Bull. World Health Organ.* 77:371-374.
- 24- **Seaman, J., A.J. Mercer et E. Sondorp.** 1996. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *Int. J. Epidemiol.* 25:862-871.
- 25- **Mutinga, M.J., S.M. Kihara, A. Lohding, C.M. Mutero, T.A. Ngatia et F. Karanu.** 1989. Leishmaniasis in Kenya: description of leishmaniasis of a domestic goat from Transmaa, Navok District, Kenya. *Trop. Med. Parasitol.* 40:91-96.
- 26- **Morsy, T.A. et S.M. Abou el Seoud.** 1994. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 24:199-204.

- 27- **Fenech, F.F.** 1997. Leishmaniasis in Malta and the mediterranean basin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **91**:747-753.
- 28- **Sixl, W., Z. Sebek, F. Reinthaler et F. Mascher.** 1987. Investigations of wild animals as *Leishmania* reservoir in South Sudan. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **31**:483-485.
- 29- **Xu, Z.B., Z.C. Deng, W.K. Chen, H.L. Zhong, J.Y. You, Z.T. Liu et Y. Ling.** 1982. Discovery of naturally infected raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides gray*) wild animal reservoir host of leishmaniasis in China. *Chin. Med. J. (Engl)* **95**:329-330.
- 30- **Modabber, F.** 1987. Tropical disease research, a global partnership. *dans Eighth programme report.* World Health Organization. Genève. 1-23.
- 31- **Alvar, J., J. Verdejo, A. Osuma et R. Najera.** 1987. Visceral leishmaniasis in a patient seropositive for HIV. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**:604-606.
- 32- **de Gorgolas, M. et M.A. Miles.** 1994. Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature (London)* **372**:734.
- 33- **Cook, G.C.** 1993. Leishmaniasis: Some recent developments in chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**:327-330.
- 34- **Berman, J.D.** 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* **10**:560-586.
- 35- **Berman, J.D., D. Waddell et B.D. Hanson.** 1985. Biochemical mechanisms of antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:916-920.

- 36- **Bryceson, A.D., J.D. Chulay et M. Mugambi.** 1985. Visceral leishmaniasis irresponsive to antimonial drug. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:705-714.
- 37- **Thakur, C.P., M. Kumas et A.K. Pandey.** 1991. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:435-441.
- 38- **Berman, J.D., L.J. Goad, D.H. Beach et G.G. Holz Jr.** 1986. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:85-92.
- 39- **Scott, J.A.G., R.N. Davidson, A.H. Moody, H.R. Grant, D. Felmingham, G.M. Scott, P. Olliaro et A.D. Bryceson.** 1992. Aminoglycoside (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:617-619.
- 40- **El-On, J., G.P. Jacobs et L. Weinrauch.** 1988. Topical chemotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Today* 4:76-81.
- 41- **Faris, R.M., J.S. Jarallah, T.A. Khoja et M.J. al-Yamani.** 1993. Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. *Int. J. Dermatol.* 32:610-612.
- 42- **Berman, J.D.** 1981. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:560-569.
- 43- **Navin, T.R., B.A. Arana, F.E. Arana, J.D. Berman et J.F. Chajon.** 1992. Placebo-controlled clinical ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J. Infect. Dis.* 165:528-534.

- 44- Badaro, R., E. Falcoff, F.S. Badaro, E.M. Carvalho, D. Pedral-Sampaio et A. Barral. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N. Engl. J. Med.* 322:16-21.
- 45- Nathan, C.F., G. Kaplan, W.R. Lewis, A. Nusrat, M.D. Witmer, S.A. Sherwin, C.K. Job, C.R. Horowitz, R.M. Steinman et Z.A. Cohn. 1986. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon gamma in patients with lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 324:509-516.
- 46- Sundar, S., F. Rosenkaimer et H.W. Murray. 1994. Successful treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon- γ . *J. Infect. Dis.* 170:659-662.
- 47- Falcoff, E., N.J. Taranto, C.E. Remondegui, J.P. Dedet, L.M. Canini, C.M. Ripoll, L. David-Dimier, F. Vargas, L.A. Gimenez, J.G. Bernado et al. 1994. Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon- γ and pentavalent antimonial compounds. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:95-97.
- 48- Akuffo, H., G. Kaplan, R. Kussling, S. Teklemariam, M. Dietz, J. Mc Elrath et Z.A. Cohn. 1990. Administration of recombinant interleukin-2 reduces the local parasite load of patients with disseminated cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 161:775-780.
- 49- Badaro, R., C. Nascimento, J.S. Carvalho, F. Badaro, D. Russo, J.L. Ho, S.G. Reed, W.D. Johnson Jr. et T.C. Jones. 1994. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 170:413-418.

- 50- **Muyombwe, A., M. Olivier, P. Harvie, M.G. Bergeron, M. Ouellette et B. Papadopoulou.** 1998. Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J. Infect. Dis.* 177:188-195.
- 51- **Armijos, R.X., M.M. Weigel, H. Aviles, R. Maldonado et J. Racines.** 1998. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J. Infect. Dis.* 177:1352-1357.
- 52- **Bos, J.D. et M.L. Kapsenberg.** 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today* 14:75-78.
- 53- **Kupper, T.S.** 1990. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* 86:1783-1789.
- 54- **Kupper, T.S.** 1990. The role of epidermal cytokines. *dans Immunophysiology: the role of cells and cytokines in immunity and inflammation.* Shevach, E. et J. Oppenheim (éditeurs) *Oxford University Press.* New York. 285-305.
- 55- **Nickoloff, B.J.** 1988. Role of interferon-gamma in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch. Dermatol.* 124:1835-1843.
- 56- **Sadick, M.D., R.M. Locksley, C. Tubbs et H.V. Raff.** 1986. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate IFN- γ in response to *Leishmania* antigens *in vitro.* *J. Immunol.* 136:655-661.
- 57- **Titus, R.G., B. Sherry et A. Cerami.** 1989. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 170:2097-2104.

- 58- Scott, P., P. Natovitz, R.L. Coffman, E. Pearce et A. Sher. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbating belong to different T helper subsets and responds to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* 168:1675-1684.
- 59- Heinzl, F.P., M.D. Sadick, S.S. Mutha et R.M. Locksley. 1991. Production of interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7011-7015.
- 60- Sypek, J.P., C.L. Ching, S.E. Mayor, J.M. Subramanyam, S.J. Goldman, D.S. Suburth, S.F. Wolf et R.G. Schaub. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin-12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177:1797-1802.
- 61- Chatelain, R., K. Varkila et R.L. Coffman. 1992. IL-4 induces a TH2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* 148:1182-1187.
- 62- Lima, G.M.A.C., A.L. Valloche, U.R. Silva, E.M.A.F. Bevilacqua, M.M.F. Kiffer et I.A. Abrahamson. 1998. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immuno. Lett.* 64:145-151.
- 63- Melby, P.C., F.J. Andrade-Narvaez, B.J. Darnell, G. Valencio-Pacheco, V.V. Tryon et A. Palomo-Cetina. 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62:837-842.
- 64- Ritter, U., H. Moll, T. Laskay, E. Brocker, O. Velazco, I. Becker et R. Gullitzer. 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173:699-709.

- 65- Vester, B., K. Muller, W. Solbach et T. Laskay. 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 67:3155-3159.
- 66- Lewis, R.E., M. Buchsbaum, D. Whitaker et G.F. Murphy. 1989. Intercellular adhesion molecule expression in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J. Invest. Dermatol.* 93:672-677.
- 67- Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliviera, F. Conceicao-Silva et R.L. Modlin. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91:1390-1395.
- 68- Caceres-Dittmar, G., F.J. Tapia, M.A. Sanchez, M. Yamamura, K. Uyemura, R.L. Modlin, B.R. Bloom et J. Convit. 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 91:500-505.
- 69- Karp, C.L., S.H. El-Safi, T.A. Wynn, M.M. Sati, A.M. Kordofani, F.A. Hashim, M. Hoh-Ali, F.A. Nevan, T.B. Nutman et D.L. Sacks. 1993. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J. Clin. Invest.* 91:1644-1648.
- 70- Ghalib, H.W., M.R. Pievezam, Y.A.W. Skeiky, M.R. Piuvezan, Y.A. Skeiky, M. Sidding, F.A. Hashim, A.M. el-Hassan, D.M. Russo et S.G. Reed. 1993. Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J. Clin. Invest.* 92:324-329.
- 71- Cotterell, S.E.J., C.R. Engwerda et P.M. Kaye. 1999. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokines, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 29:203-214.

- 72- **Murray, H.W., B.Y. Rubin et C.D. Rothermel.** 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J. Clin. Invest.* 72:1506-1512.
- 73- **Adams, D.O. et T.A. Hamilton.** 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2:283-318.
- 74- **Hamilton, T.A., Y. Ohmori, S. Narumi et C.S. Tannenbaum.** 1992. Regulation of diversity of macrophage activation *dans Phagocytes in Cell Biology.* 47-69.
- 75- **North, R.J.** 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121:806-809.
- 76- **Grabstein, K.H., D.L. Urdal. R.J. Tushinski, D.Y. Mochizuki, V.L. Price, M.A. Cantrell, S. Gillis et P.J. Copnlon.** 1986. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232:506-508.
- 77- **Mace, K.F., M.J. Ehrke, K. Hori, D.L. Maccubin et E. Mihich.** 1988. Role of tumor necrosis factor in macrophage activation and tumoricidal activity. *Cancer Res.* 48:5427-5432.
- 78- **Nathan, C.F., H.W. Murray, M.E. Wiebe et B.Y. Rubin.** 1983. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity. *J. Exp. Med.* 158:670-689.
- 79- **Reed, S.G. et P. Scott.** 1993. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* 5:524-531.

- 80- **Reiner, N.E.** 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today* **15**:374-381.
- 81- **Stamler, J.S., D.J. Singel et J. Loscalzo.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**:1898-1902.
- 82- **Lehrer, R.I., A.K. Lichtensein et T. Ganz.** 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann. Rev. Immunol.* **11**:105-128.
- 83- **Hiemstra, P.S., P.B. Eisenhauer, S.S.L. Harwig, M.T. Van den Barselaar, R. Van Furth et R.I. Lehrer.** 1993. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect. Immun.* **61**:3038-3046.
- 84- **Orlandi, P.A. et S.J. Turco.** 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**:10387-10391.
- 85- **McConville, M.J. et J.M. Blackwell.** 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **266**:15170-15179.
- 86- **Turco, S.J.** 1988. The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Parasitol. Today* **4**:255-257.
- 87- **Turco, S.J. et A. Descoteaux.** 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:65-94.
- 88- **Mosser, D.M., J.M. Wedgwood et P.J. Edelson.** 1985. *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* **134**:4128-4131.

- 89- Puentes, S.M., R.P. da Silva, D.L. Sacks, C.H. Hammer et K.A. Joiner. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145:4311-4316.
- 90- Brittingham, A., C.J. Morrison, W.R. Mc Master, B.S. Mc Gwire, K.-P. Chang et D.M. Mosser. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155:3102-3111.
- 91- Lewis, C. et J. Mc Gee. 1992. The natural immune system, the macrophage. *IRL Press Inc.* Oxford University Press. 423 pages.
- 92- Moore, K.J. et G. Matlashewki. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 152:2930-2937.
- 93- Mosser, D.M. et L.A. Rosenthal. 1993. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell. Biol.* 4:315-325.
- 94- Alexander, J. et D.G. Russel. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31:175-253.
- 95- Culley, F.J., R.A. Harris, P.M. Kaye, K.P.W.J. Mc Adam et J.G. Raynes. 1996. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J. Immunol.* 156:4691-4696.
- 96- Bodgan, C. et M. Rollinghoff. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 28:121-134.

- 97- Desjardins, M. et A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185:2061-2068.
- 98- Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. Mc Neil, S.J. Turco, J.C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen et B.R. Bloom. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2453-2457.
- 99- McNeely, T.B. et S.J. Turco. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* 144:2745-2750.
- 100- Seay, M.B., P.L. Heard et G. Chaudhuri. 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytotoxicity inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.* 64:5129-5137.
- 101- Buchmüller-Rouiller, Y. et J. Mauël. 1987. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect. Immun.* 55:587-593.
- 102- Passwell, J.H., J. Smolen et C.L. Jaffe. 1994. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int. J. Exp. Pathol.* 75:277-284.
- 103- Olivier, M., R.W. Brownsey et N.E. Reiner. 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7481-7485.
- 104- Wilson, E., M.C. Olcott, R.M. Bell, A.H. Merrill et J.D. Lambeth. 1986. Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. *J. Biol. Chem.* 261:12616-12623.

- 105- **Pontremoli, S., E. Melloni, F. Salcimino, B. Sparatore, M. Michetti, O. Sacco et B.L. Horecker.** 1986. Activation of NADPH oxidase and phosphorylation of membrane proteins in human neutrophils: Coordinate inhibition by a surface antigen-directed monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**:1121-1126.
- 106- **Descoteaux, A. et S.J. Turco.** 1993. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today* **9**:468-471.
- 107- **Sorensen, A.L., A.S. Hey et A. Kharazmi.** 1994. *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils *in vitro*. *APMIS.* **102**:265-271.
- 108- **Liew, F.Y., S. Millot, C. Parkinson, R.M.J. Palmer et S. Moncada.** 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**:4794-4797.
- 109- **Green, S.F., C.A. Nacy et M.S. Meltzer.** 1991. Cytokine-induced synthesis of nitric oxide in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **50**:93-103.
- 110- **Evans, T.G., L. Thai, D.L. Granger et J.B. Hibbs Jr.** 1993. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J. Immunol.* **151**:907-915.
- 111- **Proudfoot, L., A.V. Nikolaev, G.-J. Feng, W.Q. Wei, M.A. Ferguson, J.S. Brimacombe et F.Y. Liew.** 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmaniacidal activity by glycoconjugated of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:10984-10989.

- 112- Proudfoot, L., C.A. O'Donnell et F.Y. Liew. 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmaniacidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25:745-750.
- 113- Gajewski, T.F. et F.W. Fitch. 1988. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immunoregulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140:4245-4252.
- 114- Mossman, T.R. et R.L. Coffman. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173.
- 115- Frendl, G. et D.I. Beller. 1990. Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, including Ia and lymphocyte function-associated antigen but not cytotoxicity. *J. Immunol.* 144:3392-3399.
- 116- Heinzl, F.P., R.M. Rerko, F. Ahmed et E. Pearlman. 1995. Endogenous IL-12 is required for control of TH2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J. Immunol.* 155:730-739.
- 117- Weiser, W.Y., A. Van Niel, S.C. Clark, J.R. David et H.G. Remold. 1987. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activate intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 166:1436-1446.
- 118- Liew, F.Y. et S. Millot. 1990. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmaniacidal activity is mediate by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 71:556-559.

- 119- **Kurland, J.L. et R.J. Bockman.** 1978. Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 147:952-957.
- 120- **Milano, S., F. Arcoleo, M. Dieli, R. D'Agostino, G. De Nucci, P. D'Agostino et E. Cillari.** 1996. *Ex vivo* evidence for PGE₂ and LTB₄ involvement in cutaneous leishmaniasis: Relation with infection status and cytokine production. *Parasitology* 112:13-19.
- 121- **Farrell, J.P. et C.E. Kirkpatrick.** 1987. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J. Immunol.* 138:902-907.
- 122- **Kunkel, S.L., R.C. Wiggind, S.W. Chensue et J. Larrick.** 1986. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:404-410.
- 123- **Snyder, D.S. et E.R. Unamel.** 1982. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature* 299:163-165.
- 124- **Reiner, N.E. et C.J. Malemud.** 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J. Immunol.* 134:556-563.
- 125- **Barral-Netto, M., A. Barral, C.E. Brownell, Y.A.W. Sheiky, LR. Ellingworth, D.R. Twardzik et S.G. Reed.** 1992. TGF- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257:545-548.

- 126- Ding, A., C.F. Nathan, J. Graycar, R. Derynck, D.J. Stiller et S. Srinivasan. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming-growth factor- β 1- β 2, and β 3 inhibits induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J. Immunol.* **145**:940-944.
- 127- Barral, A., M. Barral-Netto, E.C. Yong, C.E. Brownell, D.R. Twardzik et S.G. Reed. 1993. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3442-3446.
- 128- Reiner, N.E. 1987. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin-1 response to *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* **138**:1919-1925.
- 129- Reiner, N.E., W. Ng, C.B. Wilson, W.R. McMaster et S.K. Burchett. 1990. Modulation of *in vitro* monocyte inhibition of interleukin-1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor- α and interleukin-1. *J. Clin. Invest.* **85**:1914-1924.
- 130- Ho, J.L., R. Badaro, A. Schwartz, C.A. Dinarello, J.A. Gelfand, J. Sobel, A. Barral, M. Barral-Netto, E.M. Carvalho, S.G. Reed et W.D. Johnson Jr. 1992. Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *J. Infect. Dis.* **165**:1094-1102.
- 131- Hatzigeorgiou, D.E., J. Geng, B. Zhu, Y. Zhang, K. Liu, W.N. Rom, M.J. Fenton, S.J. Turco et J.L. Ho. 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin-1 β gene expression in human monocytes a unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14708-14713.
- 132- Tumang, M.C.T., C. Keogh, L.L. Moldawer, D.C. Helfgott, R. Teitelbaum, J. Hariprasad et H.W. Murray. 1994. Role and effect of TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* **153**:768-775.

- 133- **Pisa, P., M. Gennene, O. Söder, T. Ottenhoff, M. Hansson et R. Kiessling.** 1990. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **161**:988-991.
- 134- **Scuderi, P., K.S. Lang, K.J. Ryan, E. Petersen, K.E. Sterling , P.R. Finley, C.G. Ray, D.L. Slymen et S.E. Salmon.** 1986. Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* **2**:1364-1365.
- 135- **Descoteaux, A. et G. Matlashewski.** 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5223-5227.
- 136- **Kunkel, S.L., M. Spengler, M.A. May, R. Spengler, J. Larrik et D. Remick.** 1988. Prostaglandin E₂ regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **263**:5380-5384.
- 137- **Carrera, L., R.T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Müller, R. Kükn et D.L. Sacks.** 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin-12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* **183**:515-526.
- 138- **Sartori, A., M.A.P. Oliveira, P. Scott et G. Trinchieri.** 1997. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J. Immunol.* **159**:2849-2857.
- 139- **Liew, F.Y., X.Q. Wei et L. Proudfoot.** 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasite infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **352**:1311-1315.
- 140- **Kaye, P.M.** 1995. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. *Immunol. Today* **16**:423-427.

- 141- Reiner, N.E., W. Ng, T. Ma et W.R. Mc Master. 1988. Kinetics of γ -interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4330-4334.
- 142- De Souza-Leao, S., T. Lang, E. Prina, R. Hellio et J.C. Antoine. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell. Sci.* 108:3219-3231.
- 143- Saha, B., G. Das, H. Vohra, N.K. Ganguly et G.C. Mishra. 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.* 25:2492-2498.
- 144- Locksley, R.M., S.L. Reiner, F. Hatam, D.R. Littman et N. Killen. 1993. Helper T cell without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science* 261:1448-1451.
- 145- Kima, P.E., L. Soong, C. Chicarro, N.H. Ruddle et D. Mc Mahon-Pratt. 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 26:3163-3169.
- 146- Krebs, E.G. et J.A.C. Beavo. 1989. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48:923-959.
- 147- Krebs, E.G. 1994. The growth research on protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 227:439.
- 148- Hunter, T. 1987. A thousand and one protein kinases. *Cell* 50:823-829.

- 149- **Trowbridge, I.S. et M.L. Thomas.** 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Ann. Rev. Immunol.* 12:85-116.
- 150- **Guan, K., R.S. Haun, S.J. Watson, R.L. Geahlen et J.E. Dixon.** 1990. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1501-1505.
- 151- **Tonks, N.K. et B.G. Neel.** 1996. From form to function: Signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 87:365-368.
- 152- **Saito, H. et M. Streuli.** 1991. Molecular characterization of protein tyrosine phosphatases. *Cell Growth Differen.* 2:59-65.
- 153- **Sun, H. et N.K. Tonks.** 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 227:480-485.
- 154- **Shiroo, M., L. Goff, M. Biffen, E. Shivnan et D. Alexander.** 1992. CD45-tyrosine phosphatase-activated p59 fyn couples the T-cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein-kinase-C activation and calcium influx. *EMBO J.* 11:4887-4897.
- 155- **Koretzky, G.A., J. Picus, M.L. Thomas et A. Weiss.** 1990. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* 346:66-68.
- 156- **Bennett, A.M., S.F. Hausdorff, A.M. O'Reilly, F.J.R. M et B.G. Neel.** 1996. Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 16:1189-1202.

- 157- **Tang, T.L., R.M. Freeman, A.M. O'Reilly, B.G. Neely et S.Y. Sokol.** 1995. The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of Map-kinase for early *Xenopus* development. *Cell* **80**:473-483.
- 158- **D'Ambrosio, D., K.L. Hippen, S.A. Minstkoff, I. Mellman, G. Pani, K.A. Siminovitch et J.C. Cambier.** 1995. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc γ RII β . *Science* **268**:293-297.
- 159- **Frearson, J.A. et D.R. Alexander.** 1997. The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *BioEssays* **19**:417-427.
- 160- **Unkeless, J.C. et J. Jin.** 1997. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:338-343.
- 161- **Vivier, E. et M. Daëron.** 1997. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today* **18**:286-291.
- 162- **Bignon, J.S. et K.A. Siminovitch.** 1994. Identification of PTP1C mutations as a genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the roles of protein tyrosine phosphatases in the regulation of hematopoietic cell differentiation and function. *Cell. Immunopathol.* **73**:168-179.
- 163- **Kozlowski, M., I Mlinaric-Rascan, G.-S. Feng, R. Shen, T. Pawson et K.A. Siminovitch.** 1993. Expression and catalytic activity of the tyrosine motheaten and viable motheaten mice. *J. Exp. Med.* **178**:2157-2163.
- 164- **Tsui, H.W., K.A. Siminovitch, L. de Souza et F.W.L. Tsui.** 1993. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nature Genetics* **4**:124-129.

- 165- **Green, M.C. et L.D. Shultz.** 1975. Moheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and Pathology. *J. Hered.* **66**:250-258.
- 166- **Neel, B.G.** 1993. Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases. *Semin. Cell. Biol.* **4**:419-432.
- 167- **Yi, T., A.L. Mui, G. Krystal et J.N. Ihle.** 1993. Haematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**:7577-7586.
- 168- **Klingmüller, U., U. Lorenz, L.C. Cantley, B.G. Neel et H.F. Lodish.** 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**:729-738.
- 169- **Chen, H.E., S. Chang, T. Trub et B.G. Neel.** 1996. Regulation of colony-stimulating factor-1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3686-3697.
- 170- **Pani, G., M. Kozlowski, J.C. Cambier, G.B. Mills et K.A. Siminovitch.** 1995. Identification of the tyrosine-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J. Exp. Med.* **181**:2077-2084.
- 171- **Pani, G., K.D. Fisher, I. Mlinaric-Rascan et K.A. Siminovitch.** 1996. Identification of the tyrosine-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J. Exp. Med.* **184**:839-852.
- 172- **Kozlowski, M., L. Larose, F. Lee, D.M. Le, R. Rottapel et K.A. Siminovitch.** 1998. SHP-1 binds and negatively modulates the c-kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**:2089-2099.

- 173- **Doody, G.M., L.B. Justement, C.C. Delibrias, J.R. Matthews, M.L. Thomas et D.T. Fearon.** 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269**:242-244.
- 174- **Kon-Kozlowski, M., G. Pani, T. Pawson et K.A. Siminovitch.** 1996. The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2 and mSos1 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **271**:3856-3862.
- 175- **Roach, T.I.A., S.E. Slater, L.S. White, X. Zhang, P.W. Majerus, E.J. Brown et M.L. Thomas.** 1998. The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates integrin-mediated adhesion of macrophages. *Curr. Biol.* **8**:1035-1038.
- 176- **Posner, B.I., R. Faure, J.W. Burgess, A.P. Bevan, D. Lachance, G. Zhang-Sun, I.G. Fantus, J.B. Ng, D.A. Hall, B. Soolum et A. Shaver.** 1994. Peroxovanadium compounds, a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J. Biol. Chem.* **269**:4596-4604.
- 177- **Bevan, A.P., J.W. Yale, P.G. Drake, D. Lachance, G. Baquiran, A. Shaver et B.I. Posner.** 1995. *In vivo* insulin mimetic effects of pV compounds: role for tissue targeting in determining potency. *Endocrinol. Metab.* **31**:E60-E66.
- 178- **Barbeau, B., R. Bernier, N. Dumais, G. Briand, M. Olivier, R. Faure, B.I. Posner et M.J. Tremblay.** 1998. Activation of HIV-1 long terminal repeat transcription and virus replication via NF- κ B-dependent and -independent pathways by potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors, the peroxovanadium compounds. *J. Biol. Chem.* **272**:12968-12977.
- 179- **Nechay, N.R.** 1984. Mechanisms of action of vanadate. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**:501-524.

- 180- Tolman, E.L., E. Barris, M. Burns, A. Pansini et R. Partridge. 1979. Effects of vanadium on glucose metabolism *in vitro*. *Life Sci.* **25**:1159-1164.
- 181- Heyliger, C.E., A.G. Tahilliani et J.H. Mc Neill. 1985. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science (Wash DC)* **227**:1474-1477.
- 182- Meyerovitch, J., Z. Farfel, J. Sack et Y. Shechter. 1987. Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptocin-treated rats. *J. Biol. Chem.* **262**:6658-6662.
- 183- Shaver, A., J.B. Ng, D.A. Hall et B.I. Posner. 1995. The chemistry of peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. *Mol. Cell. Biochem.* **153**:5-15.
- 184- Olivier, M., B.-J. Romero-Gallo, C. Matte, J. Blanchette, B.I. Posner, M.J. Tremblay et R. Faure. 1998. Modulation of interferon- γ -induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibitors. Effect on murine leishmaniasis progression. *J. Biol. Chem.* **273**:13944-13949.
- 185- Rubin, R.P. 1974. Calcium and the secretory process. *Plenium Press*. New York et Londres. 189 pages.
- 186- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:395-433.
- 187- Scharff, O. et B. Foder. 1993. Regulation of cytosolic calcium in blood cells. *Physiol. Rev.* **73**:547-582.
- 188- Rasmussen, H. et J.E. Rasmussen. 1990. Calcium as intracellular messenger: from simplicity to complexity. *Curr. Trop. Cell. Regul.* **31**:1-109.

- 189- **Pietrobon, D., F. Di Virgilio et T. Pozzan.** 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **193**:599-622.
- 190- **Parekh, A.B. et R. Penner.** 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* **77**:901-930.
- 191- **Putney, J.W. Jr.** 1986. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **7**:1-12.
- 192- **Putney, J.W. Jr.** 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**:611-624.
- 193- **Albritton, N.L., T. Meyer et L.S. Stryer.** 1992. Range of messenger action of calcium and inositol 1,4,5-triphosphate. *Science* **258**:1812-1815.
- 194- **Berridge, M.J et R.F. Irvine.** 1989. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature Lond.* **341**:197-205.
- 195- **Hoth, M. et R. Penner.** 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**:353-356.
- 196- **Mapita, R.C. et R.Y. Tsien.** 1995. Emptying of intracellular calcium stores release a novel small messenger that stimulates calcium influx. *Nature* **364**:809-814.
- 197- **Mason, M.J., C. Garcia-Rodriguez et S. Grinstein.** 1991. Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**:20856-20862.
- 198- **Demaurex, N., D.P. Lew et K.-H. Krause.** 1992. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca^{2+} stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **267**:2318-2324.

- 199- Olivier, M., K.E. Baimbridge et N.E. Reiner. 1992. Stimulus-response coupling in monocyte infected with *Leishmania* attenuation of Ca^{2+} transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphate. *J. Immunol.* **148**:1188-1196.
- 200- Olivier, M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca^{2+} . *Parasitol. Today* **12**:145-150.
- 201- Turco, S.J. et A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:65-94.
- 202- Descoteaux, A., G. Matlashewski et S.J. Turco. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Immunol.* **149**:3008-3015.
- 203- McNeely, T.B. et S.J. Turco. 1987. Inhibition of protein kinase C by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**:653-657.
- 204- McNeely, T.B., G. Rosen, M.V. Londner et S.J. Turco. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosyl phosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J.* **259**:601-604.
- 205- Radzioch, D., B. Bottazzi et L. Varesio. 1987. Augmentation of c-fos mRNA expression by activators of protein kinase C in fresh, terminally differentiated, resting macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **7**:595-599.

- 206- **Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K.A. Siminovitch et M. Olivier.** 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired interferon- γ -triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol.* **29**:3737-3744.
- 207- **Ho, J.L., H.-K. Kim, P.M. Sass, S. He, J. Geng, H. Xu, B. Zhu, S.J. Turco et S.K. Lo.** 1996. Structure-function analysis of *Leishmania* lipophosphoglycan. Distinct domains that mediate binding and inhibition of endothelial cell functions. *J. Immunol.* **157**:3013-3020.
- 208- **Lo, S.K., L. Bovis, R. Matura, B. Zhu, S. He, H. Lum, S.J. Turco et J.L. Ho.** 1998. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol.* **160**:1857-1865.
- 209- **Chernyak, L. et A.I. Tauber.** 1988. The birth of immunology: Metchnikoff, the embryologist. *Cell. Immunol.* **117**:218-233.
- 210- **Metchnikoff, E.** 1901. L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris. Masson.
- 211- **Schiffmann, E., B.A. Corcoran et S.M. Wahl.** 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1059-1062.
- 212- **Fernandez, H.N., P.M. Henson, A. Otani et T.E. Hugli.** 1978. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under stimulated *in vivo* conditions. *J. Immunol.* **120**:109-115.
- 213- **Ford Hutchinson, A.W., M.A. Bray, M.V. Doig, M.E. Shipley et M.J. Smith.** 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**:264-265.

- 214- **Shaw, J.O., R.N. Pinckard, K.S. Ferrigni, L.M. Mc Manus et D.J. Hanahan.** 1981. Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J. Immunol.* **127**:1250-1255.
- 214- **Springer, T.A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301-314.
- 216- **Furie, M.B. et G.J. Randolph.** 1995. Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.* **146**:1287-1301.
- 217- **Baggiolini, M., B. Dewald et A. Waltz.** 1992. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *dans Inflammation: Basic principles and clinical correlates* Gallin, J.I., I.M. Golstein et R. Snyderman (éditeurs). 2ième édition. Raven Press Ltd. New York. 247-263.
- 218- **Kelner, G.S., J. Kennedy, K.B. Bacon, S. Kleyensteuberm, D.A. Lagaespada, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, J.F. Bazan, K.W. Moore, T.J. Schall et A. Zlotnik.** 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**:1395-1398.
- 219- **Baggiolini, M., B. Dewald et B. Moser.** 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines -CXC and -CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**:97-179.
- 220- **Matsushima, K., K. Morishita, T. Yoshimura, S. Lairi, Y. Kobayashi, W. Lew, E. Appella, H.F. Kung, E.J. Leonard et J.J. Oppenheim.** 1988. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**:1883-1893.

- 221- **Yoshimura, T., N. Yuhki, S.K. Moore, E. Appella, M.L. Lerman et E.J. Leonard.** 1989. Human monocyte chemoattractant protein-1. Full-length cDNA cloning expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes and sequence similarity to mouse competence gene *Je*. *FEBS Lett.* 244:487-493.
- 222- **Jarmin, D.I., P.A. Kulmburg, N.E. Huber, G. Baumann, E.E. Priesche-Strassmayer et T. Baumruker.** 1994. A transcript factor with AP3-like binding specificity mediates gene regulation after an allergic triggering with IgE and antigen in mouse mast cells. *J. Immunol.* 153:5720-5729.
- 223- **Kristensen, M.S., K. Paludan, G.G. Larsen, C.O.C. Zazhariae, B.W. Delewaran, P.K.A. Jensen, P. Jorgensen et K. Thestrup-Pedersen.** 1991. Quantitative determination of IL-1- α -induced IL-8 mRNA levels in cultured human keratinocytes, dermal fibroblasts, endothelial cells and monocytes. *J. Invest. Dermatol.* 97:506-510.
- 224- **Kawahara, R.S. et T.F. Deuel.** 1989. Platelet-derived growth factor-inducible gene *Je* is a member of a family of small inducible genes related to platelet factor 4. *J. Biol. Chem.* 264:679-682.
- 225- **Brown, K.D., S.M. Zurawski, T.R. et G. Zurawski.** 1989. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors and indicators of various activation process. *J. Immunol.* 142:679-687.
- 226- **Deutsch, E., S.A. Johnson et W.H. Seers.** 1955. Differentiation of certain platelet factor to blood coagulation. *Circ. Res.* 3:110.
- 227- **Deuel, T.F, P.S. Keim, M. Farmer et R.L. Heinrikson.** 1977. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2256-2258.

- 228- **Rollins, B.J.** 1997. Chemokines. *Blood* **90**:909-928.
- 229- **Bazan, J.F., K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaver, A. Zlotnik et T.J. Schall.** 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**:640-644.
- 230- **Green, C.J., R.S. Charles, B.F. Edwards et P.H. Johnson.** 1989. Identification and characterization of PF4 var1, a human gene variant of platelet factor 4. *Mol. Cell. Biol.* **9**:1445-1451.
- 231- **Luster, A.D. et J.V. Ravetch.** 1987. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon inducible hypersensitive site. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3723-3731.
- 232- **Hebert, C.A., R.V. Viytangcol et J.B. Baker.** 1991. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.* **266**:18989-18994.
- 233- **Clark-Lewis, I., S. Schumacher, M. Baggiolini et B. Moser.** 1991. Structure-activity relationship of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH2 terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* **266**:23128-23134.
- 234- **Dewald, B., B. Moser, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini et I. Clark-Lewis.** 1990. IP-10, a gamma-interferon-inducible protein related to interleukin-8, lacks neutrophil activating properties. *Immuno. Lett.* **32**:81-84.

- 235- **Berger, M.S., C.A. Kozak, A. Gabriel et M.B. Prystowsky.** 1993. The gene for C10, a member of the beta-chemokine family, is located on mouse chromosome 11 and contains a novel second exon not found in others chemokines. *DNA Cell. Biol.* 12:839-847.
- 236- **Miller, M.D., S. Hata, R. de Waal Melefyt et M.S. Krangel.** 1989. A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 143:2907-2916.
- 237- **Kennedy, J., G.S. Kelner, S. Kleyensteuber, T.J. Schall, M.C. Weiss, H. Yssel, P.V. Schneider, B.G. Cocks, K.B. Bacon et A. Zlotnik.** 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* 155:203-209.
- 238- **Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J.A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, E. Woolf, G. Alperin, J. Culpepper, J.C. Gutierrez-Ramos et D. Gearing.** 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387:611-617.
- 239- **Mac Kay, C.R.** 1997. Chemokines: What chemokine is that? *Curr. Biol.* 7:R384-R386.
- 240- **Darbonne, W.C., G.C. Rice, M.A. Mobler, T. Apple, C.A. Herbert, A.J. Valente et J.B. Baker.** 1991. Red blood cells are a sink for interleukin-8, a leukocyte chemotaxin. *J. Clin. Invest.* 88:1362-1369.
- 241- **Horuk, R., T.J. Colby, W.C. Darbonne, T.J. Schall et K. Neote.** 1993. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry* 32:5733-5738.

- 242- **Dohlmann, H.G., J. Thorner, M.G. Caron et R.J. Lefkowitz.** 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **60**:653-688.
- 243- **Kuang, Y., Y. Wu, H. Jiang et D. Wu.** 1996. Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**:3975-3978.
- 244- **Murphy, P.M.** 1994. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Ann. Rev. Immunol.* **12**:593-633.
- 245- **Yen, H., S. Penfold, Y. Zhang et B.J. Rollins.** 1997. MCP-1-mediated chemotaxis requires of non-overlapping signal transduction pathway. *J. Leukoc. Biol.* **61**:529-532.
- 246- **Dubois, P.M., D. Palmer, M.L. Webb, J.A. Ledbette et R.A. Shapiro.** 1996. Early signal transduction by the receptor to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in a murine T cell hybrid. *J. Immunol.* **156**:1356-1361.
- 247- **Turner, L., S.G. Ward et J. Westwick.** 1995. RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J. Immunol.* **155**:2437-2444.
- 248- **La Rosa, G.J., K.M. Thomas, M.E. Kaufmann, R. Mark, M. White, L. Taylor, G. Gray, D. Witt et J. Navarro.** 1992. Aminoterminal of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:25402-25406.
- 249- **Kelvin, D.J., D.F. Michiel, J.A. Johnston, A.R. Lloyd, H. Sprenger, J.J. Oppenheim et J.M. Wang.** 1993. Chemokines and serpentine: the molecular biology of chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* **54**:604-612.

- 250- **Luster, A.D., S.M. Greenberg et P. Leder.** 1995. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J. Exp. Med.* **182**:219-231.
- 251- **Loetscher, M., T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini et B. Moser.** 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **269**:232-237.
- 252- **Willimann, K., D.F. Legler, M. Loetscher, R. Stuber Roos, M.B. Delgado, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini et B. Moser.** 1998. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur. J. Immunol.* **28**:2025-2034.
- 253- **Hedrick, J.A. et A. Zlotnik.** 1997. Identification and characterization of a novel β chemokine containing 6 conserved cysteines. *J. Immunol.* **159**:1589-1593.
- 254- **Loetscher, M., P. Loetscher, N. Brass, E. Meese et B. Moser.** 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.* **28**:3696-3705.
- 255- **Bleul, C.C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski et T.A. Springer.** 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**:829-833.
- 256- **O'Garra, A., L.M. Mc Evoy et A. Zlotnik.** 1998. T cell subsets: Chemokine receptors guide the way. *Curr. Biol.* **8**:R646-R649.
- 257- **Daugherty, B.L., S.J. Siciliano, J.A. De Martino, L. Markowitz, A. Sirotna et M.S. Springer.** 1996. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J. Exp. Med.* **183**:2349-2354.

- 258- Charo, I.F., S.J. Myers, A. Herman, C. Franci, A.J. Connelly et S.R. Coughlin. 1994. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein-1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2752-2756.
- 259- Sarafi, M.N., E.A. Garcia-Zepeda, J.A. Mac Lean, I.F. Charo et A.D. Luster. 1997. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is structural and functional of human MCP-1. *J. Exp. Med.* 185:99-109.
- 260- Combadiere, C., S.K. Ahuja, J. Van Damme, H.L. Tiffany, J.L. Gao et P.M. Murphy. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J. Biol. Chem.* 270:29671-29675.
- 261- Franci, C., L.M. Wong, D.J. Van, P. Proost et I.F. Charo. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3, but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor. *J. Immunol.* 154:6511-6517.
- 262- Kitaura, M., T. Nakajima, T. Imai, S. Harada, C. Combadiere, H.L. Tiffany, P.M. Murphy et O. Yoshie. 1996. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271:7725-7730.
- 263- Power, C.A., A. Meyer, K. Nemeth, K.B. Bacon, A.J. Hoogewerf, A.E.I. Proud et T.N.C. Wells. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J. Biol. Chem.* 270:19495-19500.

- 264- **Raport, C.J., J. Gosling, V.L. Schweickrt, P.W. Gray et L.F. Charo.** 1996. Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β and MIP-1 α . *J. Biol Chem.* **271**:17161-???.
- 265- **Yoshida, T., T. Imai, M. Kakizaki, M. Nishimura, S. Takagi et O. Yoshie.** 1998. Identification of a single C motif/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* **273**:16551-16554.
- 266- **Fong, A.M., L.A Robinson, D.A. Steeber, T.F. Ztedder, O. Yoshie, T. Imai et D.D. Patel.** 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte from adhesion, and under physiologic flow. *J. Exp. Med.* **188**:1413-1419.
- 267- **Neote, K.W., W. Darbonne, J. Orgez, R. Horuk et T.J. Schall.** 1993. Identification of a promiscuous inflammatory peptides receptor on the surface of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **268**:12247-12249.
- 268- **Szabo, M.C., K.S. Soo, A. Zlotnik et T.J. Schall.** 1995. Chemokine class difference in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**:25348-25351.
- 269- **Horuk, R., C.E. Chitnis, W.C. Darbonne, T.J. Colby, A. Rybicki, T.J. Hadley et L.H. Miller.** 1993. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* **261**:1182-1184.
- 270- **Ahuja, S.K. et P.M. Murphy.** 1993. Molecular piracy of mammalian interleukin-8 receptor type B by *Herpesvirus samiri*. *J. Biol. Chem.* **268**:20691-20694.
- 271- **Gao, J.-L. et P.M. Murphy.** 1994. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**:28539-28542.

- 272- **Kuhn, D.E., C.J. Beall et P.E. Kolattukudy.** 1995. The cytomegalovirus US28 protein binds multiple CC chemokines with high affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**:325-330.
- 273- **Bodgaghi, B., T.R. Jones, D. Zipeto, C. Vita, L. Sun, L. Laurent, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier et S. Michelson.** 1998. Chemokine sequestration by viral chemokine receptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.* **188**:855-866.
- 274- **Guo, H.G., P. Browning, J. Nicholas, G.S. Hayward, E. Tscharchler, Y.W. Jiang, S.K.A.M. Sadow, M. Raffeld, S. Colombinu, R.C. Gallo et M.S. Reitz Jr.** 1997. Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology* **228**:371-378.
- 275- **Alcami, A., J.A Symons, P.D. Collins, T.J. Williams et G.L. Smith.** 1998. Blockade of chemokine activity by soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J.Immunol.* **160**:624-633.
- 276- **Ngo, V.N., H.L. Tang et J.G. Cyster.** 1998. *Epstein-Barr virus*-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J. Exp. Med.* **188**:181-189.
- 277- **Samson, S., P.Sordeur, O. Labb., P. Soularue, G. Varssart et M. Parmentier.** 1996. Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel human gene ChemR1, expressed in T lymphocytes and polymorphonuclear cells and encoding a putative chemokine receptor. *Eur. J. Immunol.* **26**:3021-3028.
- 278- **Burgstahler, R., B. krempkes, K. Steube et M. Lipp.** 1995. Expression of the chemokine receptor BLR2/EB11 is specifically transactivated by *Epstein-Barr virus* nuclear antigen 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:737-743.

- 279- **Thelan, M., P. Peveri, P. Kernen, V. Von, T. Scharner, A. Walz et M. Baggiolini.** 1988. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte derived peptide agonist. *FASEB J.* 2:2702-2706.
- 280- **Rollins, B.J., A Walz et M. Baggiolini.** 1991. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78:1112-1116.
- 281- **Grynkiewicz, M., M. Poenie et R.Y. Tsien.** 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- 282- **Taub, D.D., K. Conlon, A.R. Llyod, J.J. Oppenheim et D.J. Kelvin.** 1993. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* 260:355-358.
- 283- **Dahinden, C.A., Y. Kurimoto, A.L. De weck, I. Lindley, B. Dewald et M. Baggiolini.** 1989. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin-3-primed basophils. *J. Exp. Med.* 170:1787-1792.
- 284- **Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald et M. Baggiolini.** 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:64-68.
- 285- **Graham, G.J., E.G. Wright, R. Hewick, S.D. Wolpe, N.M. Wilkie, D. Donaldson, S. Lorimore et I.B. Pragnell.** 1990. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344:442-444.
- 286- **Strieter, R.M., P.J. Poherini, D.A. Arenberg, A. Walz, G. Opdenakker, J. van Damme et S.L. Kunkel.** 1995. Role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J. Leukoc. Biol.* 57:752-762.

- 287- **Maione, T.E., G.S. Gray, J. Petro et A.J. Hunt.** 1990. Inhibition of angiogenesis by recombinant platelet factor 4 and related peptides. *Science* **247**:77-79.
- 288- **Bordoni, R., R. Fine, D. Murray et A. Richmond.** 1990. Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, neurocytes, and malignant melanocytes. *J. Cell. Biochem.* **44**:207-219.
- 289- **Simonet, W.S., T.M. Hughes, H.Q. Nguyen, L.D. Trebasky, D.M. Danilenko et E.S. Meddock.** 1994. Long-term impairment of neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. *J. Clin. Invest.* **94**:1310-1319.
- 290- **Fuentes, M.E., S.K. Durham, M.R. Swerdel, A.C. Lewis, D.S. Barton, J.R. Megill, R. Bravo et S.A. Lira.** 1995. Controlled recruitment of monocytes/macrophages to specific organs through transgenic expression of MCP-1. *J. Immunol.* **155**:5769-5776.
- 291- **Lira, S.A., P. Zalamea, J.N. Heinrich, M.E. Fuentes, D. Carrasco, A.C. Lewin, D.S. Barton, S. Durham et R. Bravo.** 1994. Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermidis of transgenic mice results in a marked infiltration of a single class of inflammatory cells. *J. Exp. Med.* **180**:2039-2048.
- 292- **Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons, A.H. Johnsen et al.** 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science* **277**:1656-1659.
- 293- **Moore, P.S., C. Boshoff, R.A. Weiss et Y. Chang.** 1996. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* **274**:1739-1744.
- 294- **Boshoff, C., Y. Takeuchi, J. Reeves, Y. Endo, T. Sakaki, P. Collins, T. Williams, V. Schweickart et al.** 1997. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science* **278**:290-294.

- 295- Lalani, A.S., K. Graham, K. Mossman, K. Rajarathnam, I. Clark-Lewis, D. Kelvin et G. Mc Fadden. 1997. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with heparin-binding domains of chemokines. *J. Virol.* 71:4356-4363.
- 296- Graham, K.A., A.S. Lalani, J. Macen, T.L. Ness, M. Barry, L.Y. Liu, A. Lucas, I. Clark-Lewis, R.W. Moyer et G. Mc Fadden. 1997. The T1/35 kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into infected tissues. *Virology* 229:12-24.
- 297- Smith, C.A., T.D. Smith et R.G. Goodwin. 1997. T1 poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptor. *Virology* 236:316-322.
- 298- Mizgerd, J.P., B.B. Meek, G.J. Kutkoski, D.C. Bullard, A.L. Beaudet et C.M. Doerschuk. 1996. Selectins and neutrophil traffic: margination and *Streptococcus pneumoniae*-induced emigration in murine lungs. *J. Exp. Med.* 184:639-645.
- 299- Ebnet, K., M.M. Simon et S. Shaw. 1996. Regulation of chemokine gene expression in human endothelial cells by proinflammatory cytokines and *Borrelia burgdorferi*. *Ann. NY Acad. Sci.* 797:107-117.
- 300- Eckman, L., M.F. Kagnoff, et J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial injury. *Infect. Immun.* 61:4569-4574.
- 301- McCormick, B., P. Horman, J. Kim, D. Carnes, S. Miller et J. Madara. 1995. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J. Cell. Biol.* 131:1599-1608.

- 302- **McCormick, B.A., C.A. Pankos, S.P. Colgan, D.K. Carnes et J.L. Madara.** 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* **160**:455-466.
- 303- **Zhou, Y., Y. Yang, G. Warr et R. Bravo.** 1999. LPS down-regulates the expression of chemokine receptor CCR2 in mice and abolishes macrophage infiltration in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **65**:265-269.
- 304- **Standiford, T.J., S.L. Kunkel, M.J. Greenberger, L.L. Laichalk et R.M. Strieter.** 1996. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J. Leukoc. Biol.* **59**:24-28.
- 305- **Tsai, W.C., R.M. Strieter, J.M. Wilkowski, K.A. Bucknell, M.D. Burdick, S.A. Lira et T.J. Standiford.** 1998. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J. Immunol.* **161**:2435-2440.
- 306- **Huffnagle, G.B., R.M. Strieter, T.J. Standiford, R.A. Mc Donald, M.D. Burdick, S.L. Kunkel et G.B. Toews.** 1995. The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* **155**:4790-4797.
- 307- **Doyle, H.A. et J.W. Murphy.** 1997. MIP-1 α contributes to the anticryptococcal delayed-type hypersensitivity reaction and protection against *Cryptococcus neoformans*. *J. Leukoc. Biol.* **61**:147-155.
- 308- **Huffnagle, G.B., R.M. Strieter, L.K. Mc Neil, R.A. Mc Donald, M.D. Burdick, S.L. Kunkel et G.B. Toews.** 1997. Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 α) is required for the efferent phase of pulmonary cell-mediated immunity to a *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* **159**:318-327.

- 309- **Mohammed, K.A., N. Nasreen, M.J. Ward, K.K. Mubarak, F. Rodriguez-Panadero et V.B. Antony.** 1998. *Mycobacterium*-mediated chemokine expression in pleural mesothelial cells: Role of C-C chemokines in tuberculous pleurisy. *J. Infect. Dis.* **178**:1450-1456.
- 310- **Kasahara, K., T. Tobe, M. Tomita, N. Mukaida, S. Shao-Bo, K. Matsushima, T. Yoshida, S. Sulgihara et K. Kobayashi.** 1994. Selective expression of monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 in human blood monocytes by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **170**:1238-1247.
- 311- **Krakawer, T.** 1998. Interleukin-8 production by human monocytic cells in response to Staphylococcal exotoxins is direct and independent of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Infect. Dis.* **178**:573-577.
- 312- **Hack, C.E., M. Hart, R.J. van Schijndel, A.J. Erenberg, J.H. Nuijens, L.G. Thijs et L.A. Aarden .** 1992. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect. Immun.* **60**:2835-2842.
- 313- **Kernacki, K.A., D.J. Goebel, M.S. Poosch et L.D. Hazlett.** 1998. Early cytokine and chemokine gene expression during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection in mice. *Infect. Immun.* **66**:376-379.
- 314- **Ebnet, K., K.D. Brown, U.K. Siebenlist, M.M. Simon et S. Shaw.** 1997. *Borrelial burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J. Immunol.* **158**:3285-3292.

- 315- Rasmussen, S.J., L. Eckman, A.J. Quagle, L. Shen, Y.X. Zhang, D.J. Anderson, J. Fierer, R.S. Stephen et M.F. Kagnoff. 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 99:77-87.
- 316- Naumann, M., S. Wessler, E. Bartsch, B. Wieland et T.F.Meyer. 1997. *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cells interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappa B and activator protein-1 and the induction of inflammatory cytokines. *J. Exp. Med.* 186:247-258.
- 317- Tonetti, M.S., M.A. Imboden, L. Gerber, N.P. Lang, J. Laissue et C. Mueller. 1994. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect. Immun.* 62:4005-4014.
- 318- Huang, G.T., S.K. Haake, J.W. Kim et N.H. Park. 1998. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbial. Immunol.* 13:301-309.
- 319- Huang, G.T., S.K. Haake et N.H. Park. 1998. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J. Periodontol.* 69:1105-1110.
- 320- Taha, A.S., R.W. Kelley, G. Carr, B. Steimer, R. Morton, R.H. Park et A.D. Beatie. 1996. Altered urinary interleukin-8/creatinine ratio in peptic ulcer disease: pathological and diagnostic implications. *Am. J. Gastroenterol.* 91:2528-2531.

- 321- **Bliss, C.M. Jr, D.T. Golenbock, S. Keater, J.K. Linevsky et C.P. Kelly.** 1998. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide-78 and monocyte chemotactic protein-1 by human monocytes. *Infect. Immun.* 66:5357-5363.
- 322- **Tomee, J.F., A.T. Wierenga, P.S. Hiemstra et H.K. Kauffman.** 1997. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J. Infect. Dis.* 176:300-303.
- 323- **Schulte, R., P. Wattiau, E.L. Hartland, R.M. Robins-Browne et G.R. Cornelius.** 1996. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 64:2106-2113.
- 324- **Mahida, Y.R., S. Makh, S. Hyde, T. Gray et S.P. Borriello.** 1996. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin-8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut.* 38:337-347.
- 325- **Gibson, F.C., A.O. Tzianabos et B. Onderdonk.** 1996. The capsular polysaccharide complex of *Bacteroides fragilis* induces cytokine production from human and murine phagocytic cells. *Infect. Immun.* 64:1065-1069.
- 326- **Zanussi, S., M. D'Andrea, C. Simonelli, V. Battiston, U. Tirelli et P. De Paoli.** 1996. CD8⁺ T cells in HIV infection produce macrophage inflammatory protein-1 α and RANTES: A comparative study in long term survivors and progressor patients. *Immunol. Lett.* 53:105-108.
- 327- **Cocchi, F., A.L. De Vico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo et P. Lusso.** 1995. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 270:1811-1815.

- 328- Ashorn, P.A., E.A. Berger et B. Moss. 1990. Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cells. *J. Virol.* **64**:2149-2156.
- 329- Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy et E.A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science (Wash. DC)* **272**:872-877.
- 330- Dragic, T., U. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore et W.A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature (Lond)* **381**:667-673.
- 331- Choe, H., M. Farzan, Y. Sin, N. Sullivan, B. Rollins et al. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.
- 332- Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman et R.W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that fuses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:149-1158.
- 333- Liu, R., W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M. MacDonald, H. Stuhlman, R.A. Koup et N.R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-377.
- 334- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard et al. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**:722-725.

- 335- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J.L. Virelizier et al. 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for lestr/fusin and prevents infection by T cell line-adapted HIV-1. *Nature (Lond)* **382**:833-835.
- 336- Oravecz, T., M. Pall et M.A. Norcross. 1996. Beta-chemokine inhibition of monocytoprotropic HIV-1 infection. Interference with a post-binding fusion step. *J. Immunol.* **157**:1329-1332.
- 337- De Souza, M.P. et V.A. Harden. 1996. Chemokines and HIV-1 second receptors-confluence of twofield generates optimism in AIDS research. *Nature.* **2**:1293-1300.
- 338- Lee, B. et L.J. Montaner. 1999. Chemokine immunobiology in HIV-1 pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **65**:552-565.
- 339- Amara, A., S. Le Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J.-L. Virelizier et F. Arenzana-Seisdedos. 1997. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalisation of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* **186**:139-146.
- 340- Howard, O.M.Z., T. Kortes, N.I. Tarasova, M. Grimm, J.A. Turpin, W.G. Rice, C.J. Michejda, R. Blumenthal et J.J. Oppenheim. 1998. Small molecule inhibitor of HIV-1 cell fusion blocks chemokine receptor-mediated function. *J. Leukoc. Biol.* **64**:6-13.
- 341- Schmidtmayerova, H., H.S.L. Nottet, ZG. Nuovo, T. Raabe, C.R. Flanagan, L. Dubrovsky, H.E. Gendelman, A. Cerami, M. Bukrinsky et B. Sherry. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: Implication for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:700-704.

- 342- **Tumpey, T.M., H. Cheng, X.-T. Yan, J.E. Oakes et R.N. Lausch.** 1998. Chemokine synthesis in the HSV-1-infected cornea and its suppression by interleukin-10. *J. Leukoc. Biol.* 63:486-492.
- 343- **Britt, W.J. et C.A. Alford.** 1990. Cytomegalovirus. *dans Virology.* Fields B.N., D.M. Knipe et P.M. Howley (éditeurs). *Lippicott-Raven.* Philadelphie. 2493-2523.
- 344- **Michelson, S., P. Dal Monte, D. Zipeto, B. Bodaghi, L. Laurent, E. Oberlin, F. Arenzana-Seisdedos, J.-L. Virelizier et M.P. Landini.** 1997. Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection by fibroblasts. *J. Virol.* 71:6495-6500.
- 345- **Grundy, J.E., K.M. Lawson, L.P. Mac Cormac, J.M. Fletcher et K.L. Yong.** 1998. *Cytomegalovirus*-infected endothelial cells recruit endothelial cells by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J. Infect. Dis.* 177:1465-1474.
- 346- **Murayama, T., N. Mukaida, K.S.A. Khabar et K. Matsushima.** 1998. Potentiel involvement of IL-8 in the pathogenesis of human *cytomegalovirus* infection. *J. Leukoc. Biol.* 64:62-67.
- 347- **Sprenger, H., R.G. Meyer, A. Kaufmann, D. Budfeld, E. Rischkowsky et D. Gemsa.** 1996. Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after *influenza A virus* infection. *J. Exp. Med.* 184:1191-1196.
- 348- **Cook, D.N., M.A. Beck, T.M. Coffman, S.L. Kirby, J.F. Sheridan, I.B. Pragnell et O. Smithies.** 1995. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 269:1583-1585.
- 349- **Cook, D.N.** 1996. The role of MIP-1 α in inflammation and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 59:61-66.

- 350- **Karupiah, G., R.V. Blanden et I.A. Ramshaw.** 1990. Interferon- γ is involved in the recovery of athymic nude mice from recombinant *vaccinia virus*/interleukin-2 injection. *J. Exp. Med.* **172**:1495-1503.
- 351- **Amichay, D., R.T. Gazzinelli, G. Karupiah, T.R. Moench-Asher et J.M. Farber.** 1996. Genes for chemokines mupig and crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN- γ with patterns of tissue expression that suggest non redundant roles in vivo. *J. Immunol.* **157**:4511-4520.
- 352- **Fisher, S.N., P. Vanguri, H.S. Shin et M.L. Shin.** 1995. Regulatory mechanisms of MuRANTES and CRG-2 chemokine gene induction in central nervous system glial cells by virus. *Brain Behav. Immun.* **9**:331-344.
- 353- **Kern, P., C.J. Hemmer, J. Van Damme, H.J. Gruss et M. Dietrich.** 1989. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Med.* **87**:139-143.
- 354- **Burgmann, H., U. Hollenstein, C. Wenich, F. Thalhammer, S. Looaressuwan et W. Graninger.** 1995. Serum concentrations of MIP-1 α and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**:32-36.
- 355- **Badolato, R., D.L. Sacks, D. Savoia et T. Musso.** 1996. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* **82**:21-26.
- 356- **Lima, M.F., Y. Zhang et F. Villalta.** 1997. β -chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophage stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell. Mol. Biol.* **43**:1067-1076.

- 357- Reale, M., S. Frydas, R.C. Barbacane, F.C. Placido, I. Cataldo, D. Vacalis, A. Trakatellis, G. Anogianakis, M. Felaco, M. Di Gioacchino et P. Conti. 1998. Induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and TNF alpha by *Trichinella spiralis* in serum of mice *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.* 179:1-5.
- 358- Fukomoto, S., K. Hirai, T. Tanihata, Y. Ohmori, D.J. Stuehr et T.A. Hamilton. 1997. Excretor/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinacei* reduce iNOS and chemokine mRNA levels in peritoneal macrophages stimulated with cytokines and/or LPS. *Parasite Immunol.* 19:325-332.
- 359- Chensue, S.W., K.S. Warmington, J.H. Ruths, P.S. Sanghi, P. Lincoln et S.L. Kunkel. 1996. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (Mycobacterial) and Th2 (Schistosomal) antigen-induced granuloma formation. *J. Immunol.* 157:4602-4608.
- 360- Chensue, S.W., K.S. Warmington, N.W. Lukacs, P.M. Lincoln, M.D. Burdick, R.M. Strieter et S.L. Kunkel. 1995. Monocyte chemoattractant protein expression during schistosome egg granuloma formation: sequence of production, localization, contribution and regulation. *Am. J. Pathol.* 146:130-138.
- 361- Pearlman, E, J.H. Lass, D.S. Bardenstein, E. Diaconnu, F.E. Hazlett Jr, J. Albright, A.W. Higgins et J.W. Kazura. 1997. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cells recruitment and chemokine expression. *J. Immunol.* 158:827-833.
- 362- Koch, A.E., S.L. Kunkel, B. Harlow, H.L. Johnson, H.L. Evanoff, G.K. Haines, M.D. Burdick et R.M. Strieter. 1992. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 90:772-779.

- 363- Koch, A.E., S.L. Kunkel, L.A. Harlow, D.D. Mazarakis, G.K. Haines, M.D. Burdick, R.M. Pope et R.M. Strieter. 1994. Macrophage inflammatory protein-1. A novel chemotactic cytokine form macrophages in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **93**:921-928.
- 364- Kasama, T., R.M. Strieter, N.W. Lukacs, P.M. Lincoln, M.D. Burdick et S.L. Kunkel. 1995. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* **95**:2868-2876.
- 365- Beaulieu, A.D. et S.R. Mc Coll. 1994. Differential expression of two major cytokines produced by neutrophils, IL-8 and the interleukin-1 receptor antagonist, in neutrophils isolated from the synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **37**:855-859.
- 366- Hogan, M., B. Sherry, C. Ritchlin, M. Fabre, R. Winchester, A. Cerami et R. Bucala. 1994. Differential expression of the small inducible cytokine Gro alpha and Gro beta by synovial fibroblasts in chronic arthritis. *Cytokine* **6**:61-69.
- 367- Unemori, E.N., E.P. Amento, E.A. Bauer et R. Horuk. 1993. Melanoma growth stimulatory activity/GRO decreases collagen expression by human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **268**:1338-1342.
- 368- Kunkel, S.L., N. Lukacs, T. Kasama et R.M. Strieter. 1996. The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J. Leukoc. Biol.* **59**:6-12.
- 369- Schrier, D.J., R.C. Schimmer, C.M. Flory, D. K.-L. Tung et P.A. Ward. 1998. Role of chemokines and cytokines in a reactivation model of arthritis in rats induced by injection with streptococcal cell walls. *J. Leukoc. Biol.* **63**:359-363.

- 370- **Simon, R.H. et R. Paine III.** 1995. Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J. Lab. Clin. Med.* **126**:108-118.
- 371- **Sakanashi, Y., M. Takeya, T. Yoshimura, L. Feng, T. Morioka et K. Takahashi.** 1994. Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* **56**:741-750.
- 372- **van der Velden, V.H., M.M. Verhegger, S. Bernasconi, S. Sozzani, B.A. Naber, C.A. van der Linden-van Beurben, H.C. Hoogsteden, A. Mantovani et M. Vershel.** 1998. Interleukin-1 beta and interferon-gamma differentially regulate release of monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-8 by human bronchial epithelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* **9**:269-277.
- 373- **Abdullah, F., P. Ovadia, G. Feuerstein, L.F. Neville, R. Morrison, G. Mathiak, M. Whiteford et R. Rabinovici.** 1997. The novel chemokine mob-1: involvement in adult respiratory distress syndrome. *Surgery* **122**:303-312.
- 374- **Matsumoto, T., K. Yokoi, N. Mukaida, A. Harada, J. Yamashita, Y. Watanabe et K. Matsushima.** 1997. Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.* **62**:581-587.
- 375- **Kay, A.B. et C.J. Corrigan.** 1992. Asthma, eosinophils, and neutrophils. *Br. Med. Bull.* **48**:51-64.
- 376- **Kay, A.B.** 1988. The eosinophil. *dans Pulmonary diseases and disorders* A.P. Fishman (éditeur). 2ième édition. *Mc Graw-Hill*. New York. 599-606.
- 377- **Lukacs, N.W., R.M. Strieter, S.W. Chensue et S.L. Kunkel.** 1996. Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **59**:13-17.

- 378- Jia, G.-Q., J.A. Gonzalo, C. Lloyd, L. Kremer, L. Lu, C. Martinez-A., B.K. Wershie et J.C. Gutierrez-Ramos. 1996. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 184:1939-1951.
- 379- Gonzalo, J.-A., C.M. Lloyd, D. Wen, J.P. Albar, T.N.C. Wells, A. Proudfoot, C. Martinez-A., M. Dorf, T. Bjerke, A.J. Coyle et J.-C. Gutierrez-Ramos. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188:157-167.
- 380- Cruikshank, W.W., A. Long, R.E. Tarpy, H. Kornfield, M.P. Carroll, L.T. Teran, S. Holgate et D.M. Center. 1995. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13:738-747.
- 381- Sticherling, M., E. Bornscheuer, J.-M. Schröder et E. Christophers. 1991. Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8-immunoreactivity in normal and psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* 96:26-30.
- 382- Nickoloff, B.J., G.D. Karabin, J.N.W.N. Barker, C.E. Griffiths, V. Sarma, R.S. Mitra, J.T. Elder, S.L. Kunkel et V.M. Dixit . 1991. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor- α in psoriasis. *Am. J. Pathol.* 138:129-140.
- 383- Baggiolini, M., A. Waltz et S.L. Kunkel. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84:1045-1049.

- 384- Kaplan, G., A.D. Luster, G. Hancock et Z.A. Cohn. 1987. The expression of a interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 166:1098-1108.
- 385- Enk, A.H. et S.I. Katz. 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1398-1402.
- 386- Conti, P., C. Feliciani, R.C. Barbacane, S. Frydas, F.C. Placido, I. Cataldo et M. Reale. 1999. Monocyte chemotactic protein-1 gene expression and translation in formed granulomatous calcified tissues *in vivo*. *Calcif. Tissue Int.* 64:57-62.
- 387- Graves, D.T., Y.L. Yiang, M.J. Williamson et A.J. Valente. 1989. Identification of monocytic chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* 245:1490-1493.
- 388- Luan, J., R. Shattuck-Brandt, H. Haghnegahdar, J.D. Owen, R. Strieter, M. Burdick, C. Nirodi, D. Beauchamp, K. Newson Johnson et A. Richmond. 1997. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J. Leukoc. Biol.* 62:588-597.
- 389- Tannenbaum, C.S., N. Wicker, D. Armstrong, R. Tubbs, J. Finke, R.M. Burowski et T.A. Hamilton. 1996. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J. Immunol.* 156:693-699.
- 390- Zhang, R., H. Zhang, W. Shu, A.B. Pardee, R.J. Coffey Jr et P. Liang. 1997. Mob-1, a Ras target gene, is overexpressed in colorectal cancer. *Oncogene* 14:1607-1610.
- 391- Dunn, D.L., R.A. Barke, D.C. Ewald et R.L. Simmons. 1987. Macrophages and translymphatic absorption represent the first line of host defense to the peritoneal cavity. *Arch. Surg.* 122:105-110.

- 392- **Mercer-Jones, M.A., M.S. Shrotri, M. Heinzelman, J.C Peyton et W.G. Cheadle.** 1999. Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* 65:249-255.
- 393- **Boring, L., J. Gosling, M. Cleary et I.F. Charo.** 1998. Decreased lesion formation in CCR2 *-/-* mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897.
- 394- **Kawasaki, T.** 1967. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children: clinical observations of 50 cases. *Aerugi* 16:178-222 (japonais).
- 395- **Terai, M., T. Jibiki, A. Harada, Y. Terashima, K. Yasukawa, S. Tateno, H. Hamada, S. Oana, H. Niimi et K. Matsushima.** 1999. Dramatic decrease of circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in Kawasaki disease after gamma globulin treatment. *J. Leukoc. Biol.* 65:556-572.
- 396- **Feng, L., Y. Xia, T. Yoshimura et C.B. Wilson.** 1995. Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *J. Clin. Invest.* 95:1009-1017.
- 397- **Wada, T., H. Yokoyama, N. Tomosugi, Y. Hisada, S. Ohta, T. Naito, K. Kobayashi, N. Mukaida et K. Matsushima.** 1994. Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int.* 46:455-460.
- 398- **Matsushima, K.** 1994. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin-8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 180:1135-1140.

- 399- Yokoyama, H., T. Wada, K. Furiuchi, C. Segawa, M. Shimizu, K.-I. Kobayashi, S.-b. Su, N. Mukaida et K. Matsushima. 1998. Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J. Leukoc. Biol.* 63:493-499.
- 400- Wada, T., H. Yokoyama, S. Su, N. Mukaida, M. Iwano et al. 1996. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int.* 49:761-767.
- 401- van Deventer, S.J. 1997. Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol. Ther.* 11:116-121.
- 402- Savokovic, S.D., A. Koutsouris et G. Hecht. 1997. Activation of NFkappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am. J. Physiol.* 273:C1160-C1167.
- 403- Grimm, M.C., S.K. Elsbury, P. Pavli et W.F. Doe. 1996. Enhances expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J. Leukoc. Biol.* 5:804-812.
- 404- Perry, V. 1994. Macrophages and the nervous system. Austin T.X. : R.G. (andes).
- 405- Andersson, P.-B. et V. Perry. 1991. The CNS acute inflammatory response to excitotoxic cell death. *Immuno. Lett.* 30:177-182.
- 406- Ransohoff, R.M., T.A. Hamilton, M. Tari, M.H. Stoler, H.E. Shick, J.A. Mmajor, M.L. Estes, D.M. Thomas et V.K. Tuohy. 1993. Astrocytes expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 7:592-602.

- 407- **Glabinski, A., M. Tani, R.M. Strieter, V. Tuohy et R. Ransohoff.** 1997. Synchronous synthesis of α - and β -chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* **150**:617-630.
- 408- **Ransohoff, R.M.** 1997. Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression pattern and inflammatory pathology. *J. Leukoc. Biol.* **62**:645-652.
- 409- **Ransohoff, R., P. Lehman et V. Tuohy.** 1994. Immunology of multiple sclerosis: new intricacies and new insights. *Curr. Opin. Neurol.* **7**:242-249.
- 410- **Godiska, R., D. Chantry, G.N. Dietsch et P.M. Gray.** 1995. Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuro. Immunol.* **58**:167-176.
- 411- **Pendl, G.G., E.E. Prieschl, W.Thumb, N.E. Harrer, M. Auer et T. Baumruker.** 1997. Effects of phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors on degranulation and gene induction in allergically triggered mouse mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**:392-399.
- 412- **Vaingankar, S.M. et M. Martins-Green.** 1998. Thrombin activation of the 9E3/CEF4 chemokine involves tyrosine kinases inducing c-src and the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **273**:5226-5234.
- 413- **Zen, K., J. Masuda, T. Sasaguri, C. Kosaka et J. Ogata.** 1994. Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes is regulated by cell density through protein tyrosine kinase and protein kinase C. *Exp. Cell. Res.* **215**:172-179.

- 414- **Hanazawa, S., H. Takeshita, S. Amano, T. Semba, T. Nirazuka, H. Katoch et S. Kitano.** 1993. Tumor necrosis factor-alpha induces expression of monocyte chemoattractant Je via *fos* and *jun* genes in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J.Biol.Chem.* 268:9526-9532.
- 415- **Shyy, Y.-J., Y.S. Li et P.E. Kolattukudy.** 1993. Structure of human monocyte chemotactic protein gene and its regulation by TPA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:693-699.
- 416- **Fisher, S.N., P. Vanguri, H.S. Shin et M.L. Shin.** 1995. Regulatory mechanisms of MuRANTES and CRG-2 chemokine gene induction in central nervous system glial cells by virus. *Brain. Behav. Immun.* 9:331-344.
- 417- **Colotta, F., A. Bone, J.M. Wang, M. Tattanelli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri et A. Mantovani.** 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 148:760-765.
- 418- **Roebuck, K.A, L.R. Carpenter, V. Lakshminarayanan, S.M. Page, J.N. Moy et L.L Thomas.** 1999. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of redox-responsive transcription factors AP-1 and NFkappaB. *J. Leukoc. Biol.* 65:291-298.
- 419- **Wu, C., Y. Ohmori, S. Bandyopadhyay, G. Sen et T. Hamilton.** 1994. Interferon-stimulated response element and NFkappaB sites cooperate to regulate double-stranded RNA-induced transcription of the IP-10. *J. Interferon Res.* 14:357-363.
- 420- **Majumder, S., L.Z. Zhou, P. Chaturvedi, G. Babcock, S. Aras et R.M. Ransohoff.** 1998. p48/STAT-a alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *J. Immunol.* 161:4736-4744.

- 421- **Devalaraja, M.N., D.Z. Wang, D.W. Ballard et A. Richmond.** 1999. Elevated constitutive Ikappa B kinase activity and Ikappa B-alpha phosphorylation in HS294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/Gro-alpha transcription. *Cancer Res.* **59**:1372-1377.
- 422- **Awane, M., P.G. Andres, D.J. Li et H.C. Reenecker.** 1999. NF-kappaB-inducing kinase is a common mediator of IL-17, TNF-alpha- and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **162**:5337-5344.
- 423- **Martin, T., P.M. Cardanelli, G.C. Parry, K.A. Felts et R.R. Cobb.** 1999. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NFkappaB and AP-1. *Eur. J. Immunol.* **27**:1091-1097.
- 424- **Hein, H., C. Schuler, R. Kulke, E. Christophers, J.M. Schroder et J. Bartels.** 1997. Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**:537-542.
- 425- **Xia, Y., M.E. Pauza, L. Feng et D. Lo.** 1997. RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *Am. J. Pathol.* **151**:375-387.
- 426- **Guyer, N.B., C.W. Severns, P. Wong, C.A. Feghali et T.M. Wright.** 1995. IFN-gamma induces a p91/STAT-1 alpha-related transcription factor with distinct activation and binding properties. *J. Immunol.* **155**:3472-348.
- 427- **Song, A., Y.F. Chen, K. Thamatrakoln, T.A. Storm et A.M. Krensky.** 1999. RFLAT-1 : a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity* **10** :93-103.

- 428- **Racoosin, E.L. et S.M. Beverley.** 1997. *Leishmania major* : promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* **85** :283-295.
- 429- **Pompeu, M.L., L.A. Freitas, M.L.V. Santos, M. Kowri et M. Barral-Netto.** 1991. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta. Tropica* **48** :185-193.
- 430- **Beil, W.J., G. Mlinardus-Hager, D.-Ch. Neugbauer et C. Sorg.** 1992. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J. Leukoc. Biol.* **52** :135-142.
- 431- **Matsushima, K. et J..J. Oppenheim.** 1989. Interleukin 8 and MCAF : novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* **1** :2-13.
- 432- **Ohmori, Y., L. Wyner, S. Narumi, D. Armstrong, M. Stoler et T.A. Hamilton.** 1993. Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am. J. Pathol.* **142** :861-870.
- 433- **Devergne, O., A. Marfaing-Koka, T.T. Schall, M.B. Leger-Ravet, M. Sadick et al.,** 1994. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions : involvement of macrophages and endothelial cells. *J. Exp. Med.* **179** :1689-1694.
- 434- **Murray, H.W. et C.F. Nathan.** 1999. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* : reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* **189** :741-746.
- 435- **Hobbs A.J., A. Higgs et S. Moncada.** 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39** :191-220.

- 436- **Ajuebor M.N., L. Virag, R.J. Flower, M. Perreti et C. Szabo.** 1998. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology* **95** :625-630.
- 437- **Yan, X.T., T.M. Tumpey, S.L. Kunkel, J.E. Oakes et R.N. Lausch.** 1998. Role of MIP-2 in neutrophil migration and tissue injury in the herpes simplex virus-1-infected cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39** :1854-1862.
- 438- **Tam, F.W., A.M. Karkar, J. Smith, T. Yoshimura, R. Kurrle, K. Langner et A.J. Rees.** 1996. Differential expression of macrophage inflammatory protein-2 and monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* **49** :715-721.
- 439- **Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch et J.C. Mathison.** 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding proteins. *Science* **249** :1431-1433.
- 440- **Reiner, S.L. et R.M. Locksley.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13** :151-177.
- 441- **Wolpe, S.D., B. Sherry, D. Juers, G. Davatelis, R.W. Yurt et A. Cerami.** 1989. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** :612-616.
- 442- **Bonney R.J. et J.L. Humes.** 1984. Physiological and pharmacological regulation of prostaglandin and leukotriene production by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **35** :1-10.
- 443- **Gierse, J.K., S.D. Hauser, D.P. Creely, C. Koboldt, S.H. Rangwara, P.C. Isakson et K. Seibert.** 1995. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.* **305** :479-484.

- 444- **Blanco, A., A. Habib, S. Levy-Toledano et J. Maclouf.** 1995. Involvement of tyrosine kinases in the induction of cyclooxygenase-2 in human endothelial cells. *Biochem. J.* **312** :419-423.
- 445- **Hamasaki, Y., J. Kitzler, R. Hardman, P. Netteshiem et T.E. Eling.** 1993. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **304** :226-234.
- 446- **Rzymkiewicz, D.M., J. DuMaine et A.R. Morrison.** 1995. IL-1 β regulates rat mesangial cyclooxygenase II gene expression by tyrosine phosphorylation. *Kidney Int.* **47** :1354-1363.
- 447- **Buckley B.J. et A.R. Whorton.** 1995. Arachidonic acid stimulates protein tyrosine phosphorylation in vascular cells. *Am. J. Physiol.* **269** :C1489-C1495.
- 448- **Chanumugan, P., L. Feng, S. Liou, B.C. Jang, M. Boudreau et al.** 1995. Radicol, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolisaccharide and in experimental glomerulonephritis. *J. Biol. Chem.* **270** :5418-5426.
- 449- **Kanekura, T., S.J. Laulederkind, K. Kirtikara, S. Goorha et L.R. Ballou.** 1998. Choleciferol induces prostaglandin E₂ biosynthesis and transglutaminase activity in human keratonocytes. *J. Invest. Dermatol.* **11** :34-39.
- 450- **Guan, Z., S.YL. Buckman, A.P. Pentland, M. Templeton et A.R. Morrison.** 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK-1 \rightarrow SEK-1/MKK4 \rightarrow p 38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272** :12901-12908.

451- Gui, Q., L.H. Wang, K.H. Ruan et R.J. Kulmacz. 1996. Role of Val⁵⁰⁹ in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase by isoform-selective agents. *J. Biol. Chem.* 271 :19134-19139.